

# Charakterisierung von Biopolymeren

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte  
Dissertation

vorgelegt von

**Dipl.-Ing. Tiantian Li**  
aus Shandong, China

Referent:	Prof. Dr. Matthias Rehahn
Korreferent:	Prof. Dr. Markus Busch
Tag der Einreichung:	23.Juli.2013
Tag der mündlichen Prüfung:	18.November.2013

Darmstadt 2013

D17

---

## *Danksagung*

An erster Stelle bedanke ich mich herzlich bei **Prof. Dr. Matthias Rehahn** für die Möglichkeit am Fraunhofer-Institut für Betriebsfestigkeit und Systemzuverlässigkeit LBF in der Gruppe Polymeranalytik zu promovieren.

Ein ganz besonderer Dank gilt **Dr. Wolfgang Radke** für die interessante Aufgabenstellung, die hervorragende Betreuung, stete Diskussionsbereitschaft, die zahlreichen Tipps und Ideen, und die sorgfältige Korrektur.

Bei **Dr. Roland Klein** möchte ich mich für die Projektleitung und die guten Ratschläge bedanken. Weiterhin danke ich **Karsten Rode** und **Julia Beer** für die Durchführung der MALDI-TOF-MS-Messungen, **Mirjam Weis** für die Synthese der Polylactid-Proben, und **Matthäus Mlynek** für die Pyrolyse-GC-MS-Messungen. Für die Durchführung und Diskussionen der NMR-Messungen danke ich **Dr. Frank Malz**.

Für die tolle Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Polymeranalytik, Materialanalytik, Additivierung, Hochleistungspolymere und Strukturaufklärung im Bereich Kunststoffe des Fraunhofer LBF. Es war wirklich schön, Euch alle kennenzulernen und ich danke euch sehr für die schönen Stunden, die wir gemeinsam erlebt haben.

Schließlich bedanke ich mich ganz besonders bei **meinen Eltern**, die mir dieses Studium ermöglichen und mich immer unterstützt haben. Vor allem möchte ich mich bei meinem tollen Ehemann **Hao** bedanken für die Unterstützung, das entgegengebrachte Verständnis und die Aufmunterung in schlechten Tagen.



*Every story has an ending.*

*But in life, every ending is a new beginning.*

---

## 1. Inhaltsverzeichnis

---

<b>1. INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>3. AUFGABENSTELLUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>4. THEORETISCHER TEIL.....</b>	<b>7</b>
<b>4.1. Polylactid (PLA) .....</b>	<b>7</b>
<b>4.2. Polyhydroxybutyrat (PHB) .....</b>	<b>9</b>
<b>4.3. Grundlagen der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS).....</b>	<b>9</b>
4.3.1. Gaschromatographie .....	10
4.3.2. Massenspektrometrie .....	11
4.3.3. Pyrolyse-GC-MS .....	13
<b>4.4. Grundlagen der MALDI-TOF-Massenspektroskopie .....</b>	<b>13</b>
<b>4.5. Grundlagen der Flüssigchromatographie .....</b>	<b>16</b>
4.5.1. Größenausschlusschromatographie (SEC) .....	17
4.5.2. Adsorptionschromatographie (LAC) .....	24
4.5.3. Chromatographie unter kritischen Bedingungen (LCCC) .....	26
4.5.4. Gradientenchromatographie.....	26
<b>4.6. Grundlage der Festphasenextraktion (SPE).....</b>	<b>27</b>
<b>5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>30</b>
<b>5.1. Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von PHB .....</b>	<b>30</b>
5.1.1. SEC-Messungen in Chloroform gegen PS-Standards.....	30
5.1.2. Kopplung von SEC und Lichtstreuung.....	32
5.1.3. Kopplung von SEC und Viskosimetrie .....	40
5.1.4. Kalibration mit breiten Proben.....	43
<b>5.2. Endgruppencharakterisierung von Polylactid .....</b>	<b>48</b>
5.2.1. Untersuchung mit MALDI-TOF-MS.....	49
5.2.2. GC-MS-Untersuchung.....	85
5.2.3. Trennung nach Endgruppen mittels Chromatographie .....	100
<b>6. EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>111</b>
<b>6.1. Lösungsmitteln und Chemikalien .....</b>	<b>111</b>
<b>6.2. Proben .....</b>	<b>112</b>
<b>6.3. Probenvorbereitung .....</b>	<b>112</b>
6.3.1. Partieller Abbau des PLA mit NaOH-MeOH-Lösung.....	112
6.3.2. Partieller Abbau des PLA mit PEG350 .....	113

---

6.3.3.	Partieller Abbau des PLA mit PEG2000 .....	114
6.3.4.	Festphasenextraktion (SPE) .....	115
6.3.5.	Totaler Abbau des PLA mit methanolischer NaOH-Lösung.....	116
<b>6.4.</b>	<b>MALDI-TOF-MS.....</b>	<b>116</b>
<b>6.5.</b>	<b>Pyrolyse-GC-MS.....</b>	<b>116</b>
<b>6.6.</b>	<b>GC-MS .....</b>	<b>117</b>
<b>6.7.</b>	<b>Chromatographische Messungen .....</b>	<b>118</b>
6.7.1.	SEC von PLA und deren Abbauprodukten .....	118
6.7.2.	Gradienten-HPLC und LCCC .....	119
6.7.3.	Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von PHB .....	119
6.7.4.	Datenerfassung.....	120
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</b>	<b>121</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>124</b>
8.1.	GC-Chromatogramme der Proben mit Octylester/OH-Endgruppen .....	124
8.2.	GC-Chromatogramm der mit 1,4-Butandiol gestarteten Probe .....	125
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>		<b>126</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>		<b>128</b>

---

## 2. Einleitung

---

Die Verknappung fossiler Rohstoffe, wachsende Rohölpreise sowie die stark diskutierte CO<sub>2</sub>-Problematik führen dazu, dass Polymere, die auf nachweisenden Rohstoffen basieren, zunehmend Aufmerksamkeit auf sich ziehen.

Im Vergleich zu erdölbasierten Polymeren wird bei der Herstellung biobasierter Polymere weniger fossile Energie gebraucht und weniger CO<sub>2</sub> freigesetzt.<sup>1</sup> Neben den ökologischen Vorteilen ist die Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen auch ökonomisch von Vorteil, da der Land- und Forstwirtschaft Produktions- und Einkommensalternativen geboten werden können.

Mit einem durchschnittlichen jährlichen Marktwachstum von 25 -30 % nimmt die Bedeutung von Biokunststoffen rasch zu.<sup>2</sup> Es wird geschätzt dass in Zukunft 70% der Kunststoffverpackungen durch Biopolymere substituiert werden.<sup>3</sup>

Neben den klassischen Biopolymeren wie Cellulose und Stärke, gehören Polymilchsäure (PLA) und Polyhydroxyalkanoate (PHA), deren bekanntester Vertreter die Polyhydroxybuttersäure (PHB) ist, zu den wichtigsten Biopolymeren.

Eine der besonderen Eigenschaften einiger Biopolymere ist die biologische Abbaubarkeit oder Kompostierbarkeit. Aufgrund dieser Eigenschaft werden Biopolymere in verschiedensten Bereichen eingesetzt. So werden aus PLA z.B. Folien, Formteile, Dosen, Becher, Flaschen und sonstige Gebrauchsgegenstände hergestellt.<sup>4,5</sup> Vor allem für kurzlebige Verpackungsfolien und Tiefziehprodukte wie Salatschalen oder Joghurtbecher bringt PLA großes Potenzial. Außerdem findet PLA Einsatz im medizinischen und pharmazeutischen Bereich als Kapseln für Medikamente<sup>6</sup>, chirurgisches Nahtmaterial oder vom Körper resorbierbare Schrauben, Nägeln und Implantate<sup>7</sup>. Im Vergleich zu PLA ist die Anwendung von PHB durch den hohen Preis noch stark beschränkt. Aufgrund der Biokompatibilität findet PHB großes Anwendungspotential im medizinischen Bereich.<sup>8</sup> Außerdem wird es auch mit preisgünstigen Zusatzstoffen wie Celluloseacetat<sup>9,10</sup>, Kork und Stärke<sup>11</sup> kombiniert und als PHB-Blends verwendet.

Ein großer Vorteil der Biopolymere ist, dass sie thermoplastische Eigenschaften haben und durch die typischen Technologien der Kunststofftechnik wie Extrusion und Spritzguss verarbeitet werden können. Allerdings bauen Biopolymere oftmals durch die thermische und mechanische Belastung der Verarbeitung ab.<sup>12,13</sup> Typische Abbaureaktionen sind Hydrolyse durch Feuchtigkeit, intermolekulare Umesterung, Backbiting-Reaktionen (intramolekulare Umesterung) sowie  $\beta$ -Eliminierung.<sup>14-19</sup> Durch den verarbeitungsbedingten Abbau werden die Molekulargewichtsverteilung bzw. Molekulargewichtsmittelwerte verändert, was

---

Veränderungen der Gebrauchseigenschaften wie z.B. der mechanischen Festigkeit oder der biologischen Abbaubarkeit bewirken kann.<sup>20</sup> Daher ist es notwendig, derartige Veränderungen der Molekulargewichtsverteilungen zu identifizieren, um den Verarbeitungsprozess zu optimieren und ungewollte Variationen der Gebrauchseigenschaften rechtzeitig zu erkennen und zu begegnen.

Die mittleren Molekulargewichte und Molekulargewichtsverteilung lassen sich im Allgemeinen schnell und einfach mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie (SEC/GPC) ermitteln. Zur Bestimmung korrekter und zuverlässiger Molekulargewichte wird jedoch eine Kalibration mit engverteilten Standards der gleichen chemischen Struktur wie der des Analyten benötigt. Solche Standards sind häufig für Biopolymere kommerziell nicht verfügbar. Durch eine Kalibration mit den gängigen Standards wie Polystyrol (PS) oder Polymethylmethacrylat (PMMA) können zwar relative Molekulargewichte ermittelt werden, diese liefern aber keine exakten Aussagen über den Grad und die Art des Polymerabbaus. Da die Molekulargewichte für die Gebrauchseigenschaften der Materialien von entscheidender Bedeutung sind, müssen die genauen Veränderungen der Molekulargewichte und derer Verteilungen quantifiziert werden, um die Korrelationen zwischen Molekulargewichtsverteilung und den Gebrauchseigenschaften zu bestimmen und damit eine zielgerichtete Prozessoptimierung zu erreichen. Um die wahren Molekulargewichte zu bestimmen, kann die sogenannte universelle Kalibration angewendet werden. Hierbei wird eine Basiskalibration aus kommerziellen Standards wie z.B. Polystyrol unter Verwendung der Mark-Houwink-Konstanten in die gewünschte Kalibrationskurve für den Analyten umgerechnet. Die Mark-Houwink-Konstanten sind in der Literatur für viele Polymer/Lösungsmitteln-Systeme bekannt. Für die Anwendung der universellen Kalibration besteht jedoch die Voraussetzung, dass die Analytmoleküle und Kalibrationsstandards keine enthalpischen Wechselwirkungen mit der stationären Phase aufweisen und nur durch Größenausschluss getrennt werden.

In der Literatur wurden verschiedene Phasensysteme und Kalibrationsstandards für die Bestimmung der Molekulargewichte von PLA und PHB beschrieben. Da keine Standards für PLA und PHB kommerziell verfügbar sind, sind die in der Literatur genannten Molekulargewichte meist nur relative Werte, die von den zur Kalibration eingesetzten Referenzmaterialien und den verwendeten chromatographischen Bedingungen beeinflusst werden.

Für PLA wurde als mobile Phase Chloroform<sup>21, 22</sup>, Tetrahydrofuran (THF)<sup>20, 23</sup>, Dichlormethan<sup>24, 25</sup>, Trifluorethanol (TFE)<sup>26</sup>, Hexafluorisopropanol (HFIP)<sup>27</sup> oder Dioxan<sup>28</sup> verwendet. Als stationäre Phase dienten meist Styrol-Divinylbenzolgele (SDV) verschiedener

---

Hersteller. Die Säulen wurden meist mit Polystyrol- oder Polymethylmethacrylat-Standards kalibriert. Die Bestimmung der Molekulargewichte von PLA wurde von Radke et al.<sup>29</sup> systematisch untersucht. Dabei wurden die wahren Molekulargewichte von PLA-Proben mittels Lichtstreuung ermittelt und mit den Molekulargewichten aus der universellen Kalibration, die auf einer Polystyrol-Kalibration basiert, verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass PLA und Polystyrol bei dem verwendeten chromatographischen System (SDV/THF) entsprechend einem reinen Größenausschlussmechanismus eluieren und somit der universellen Kalibration gehorchen.

Für die SEC von PHB wird meist Chloroform<sup>16, 30, 31</sup> als mobile Phase eingesetzt. Für niedermolekulare Proben wurden auch THF<sup>30</sup> oder Dioxan<sup>32</sup> verwendet. Wie bei PLA kommen in der Regel SDV als stationäre Phase und Polystyrol-Standards als Kalibrants zum Einsatz. In verschiedenen Publikationen wurden für PHB Kalibrationskurven auf Basis der universellen Kalibration<sup>33, 34</sup> erstellt, wobei die Mark-Houwink-Konstanten für PHB in Chloroform verwendet wurden, die von Akita<sup>35</sup>, Bradel<sup>33</sup> oder Marchessault<sup>36</sup> bestimmt wurden. Jedoch wurden für die verwendeten Phasensystemen die Gültigkeit der universellen Kalibration bisher noch nicht überprüft bzw. nachgewiesen, wodurch die Aussagekraft der daraus ermittelten Molekulargewichte sowie der darauf basierenden Aussagen fraglich ist. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die Gültigkeit der universellen Kalibration für das meistverwendeten SDV/Chloroform-System erfüllt ist.

Um der Verringerung der Molekulargewichte bei der Verarbeitung von Biopolymeren entgegenzuwirken, können Kettenverlängerer (*chain extender*) als Additive hinzugefügt werden, die zwei oder mehrere Polymerketten verbinden, wodurch wieder eine längere Kette gebildet wird. Für PLA sind Kettenverlängerer wie z.B. Polycarbodiimid (PCDI)<sup>13</sup>, Trinonylphenylphosphit (TNPP)<sup>37</sup> und Joncryl® der Firma BASF<sup>38</sup> kommerziell verfügbar. Derartige Kettenverlängerer sind jedoch nur für bestimmte Endgruppen einsetzbar, z.B. reagiert TNPP mit Hydroxylgruppen, während Joncryl mit Carboxyl- und Hydroxyl-Gruppen umgesetzt werden kann. Um somit einen geeigneten Kettenverlängerer einsetzen zu können werden daher Informationen über die Art der in Polymeren vorhandenen Endgruppen benötigt. Neben deren Art müssen auch die Mengen der Endgruppen quantifiziert werden, da nur ein stöchiometrisches Verhältnis von Kettenverlängerer und der reaktiven Gruppen eine effektive Kettenverlängerung bewirkt (s. Abbildung 1), während zu große oder zu kleine Mengen an Kettenverlängerern zu einer unzureichenden Molekulargewichtszunahme führt.



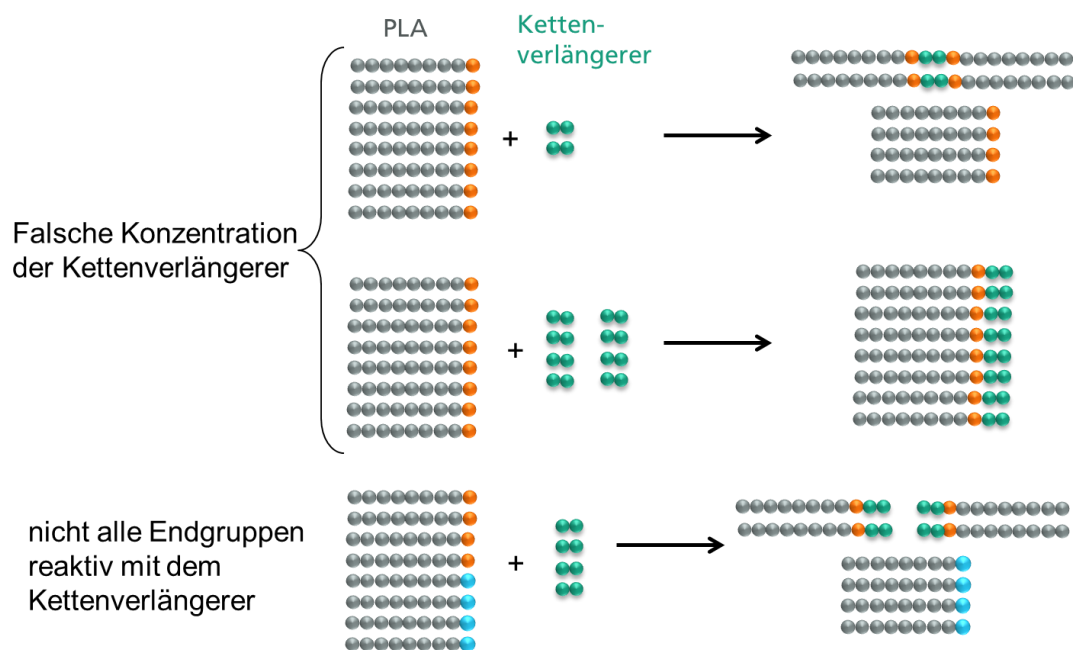


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Reaktion von PLA mit einem Kettenverlängerer.

Die Charakterisierung von Endgruppen in PLA wurde für unterschiedliche Methoden beschrieben.

Cooper<sup>39</sup>, Ju<sup>40</sup>, Báez<sup>41</sup> und Biela<sup>24</sup> verwendeten die Kernresonanz-Spektroskopie (NMR), um Endgruppen zu charakterisieren. So zeigte Báez, dass sich unterschiedliche Alkylester-Endgruppen in  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR unterscheiden lassen. Biela untersuchte sternförmige PLAs mit unterschiedlicher Anzahl an Armen mittels NMR um die mittleren Molekulargewichte der Proben zu berechnen. Jedoch ist eine Bestimmung der Endgruppenstruktur mittels NMR nur für niedermolekulare Polylactide mit einem Molekulargewicht bis zu etwa 10 000 g/mol geeignet,<sup>24</sup> da die Signalintensitäten proportional zur Konzentration der korrespondierenden funktionellen Gruppen sind und somit die Signalintensitäten der Endgruppen bei hochmolekularen Proben zu gering sind.

Báez verwendete neben der NMR auch MALDI-TOF-MS (matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeitmassenspektrometrie), um Endgruppen zu bestimmen. Es wurde gezeigt, dass im MALDI-Spektrum unterschiedliche Verteilungen, die zu Alkylester- und Carbonsäure-Endgruppen korrespondieren, beobachtet werden konnten.

Auch über die Endgruppencharakterisierung durch Chromatographie unter kritischen Bedingungen (LCCC) wurde berichtet. Biela<sup>24</sup> entwickelte eine Methode unter Verwendung der LCCC, um sternförmige PLA-Proben nach der Anzahl der OH-Endgruppen zu trennen.

---

Krüger et al.<sup>43</sup> koppelten LCCC mit MALDI-TOF-MS, um die Veränderungen der Endgruppen von PLA durch den thermischen Abbau zu untersuchen. Hierbei wurde PLA zunächst mittels LCCC getrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mittels MALDI-TOF-MS untersucht, um ihnen mögliche Endgruppen zuzuordnen. Des Weiteren nutzten Krüger et al.<sup>44</sup> die Kopplung der LCCC mit MALDI-TOF-MS um zu prüfen ob die Veresterung von PLA mit Benzylalkohol vollständig ist.

In allen der oben genannten Messungen wurden jedoch nur Oligomere oder niedermolekulare PLA-Proben mit Molekulargewichten unter 10 000 g/mol untersucht. Industriell hergestellte Polylactide für Verpackungsanwendungen oder für Medizinprodukte haben jedoch oftmals erheblich höhere Molekulargewichte (ca. 70 kDa). Über die Endgruppencharakterisierung derartiger Proben wurde bisher noch nicht berichtet. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, Methoden zu entwickeln, um die Endgruppen hochmolekularer Polylactide zu bestimmen.

---

### **3. Aufgabenstellung**

---

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu lösenden Aufgaben umfassten zwei Problemstellungen. Zum einen sollen die Molekulargewichtsverteilung und –mittelwerte des PHB bestimmt werden. Zum anderen sollten Methoden entwickelt werden, um die Endgruppen in technischen Polylactiden zu charakterisieren.

Bei der Molekulargewichtsbestimmung des PHB sollen zunächst die relativen Molekulargewichte der Proben durch SEC unter Verwendung der konventionellen Kalibration mit Polystyrol als Kalibrants ermittelt werden. Diese sollen mit den wahren Molekulargewichten verglichen werden, die durch SEC mit Lichtstreuung bestimmt werden. Dadurch soll geprüft werden, ob eine Kalibration mit Polystyrol-Standards korrekte Molekulargewichte für PHB liefern kann. Anschließend soll die SEC mit einem Viskosimeter gekoppelt werden, wobei die Berechnung der Molekulargewichte auf einer universellen Kalibration basiert. Die dadurch ermittelten Molekulargewichte sollen mit den Molekulargewichten aus Lichtstreuung verglichen werden, um zu überprüfen, ob die Voraussetzung für die universelle Kalibration, nämlich das Vorliegen eines reinen Größenausschlussmechanismus, für das verwendete chromatographische System erfüllt sind.

Zur Charakterisierung der Endgruppen von technischen hochmolekularen Polylactiden werden MALDI-TOF-MS und HPLC verwendet. Zunächst sollen die Proben mit MALDI-TOF-MS untersucht werden, um zu prüfen, ob die Endgruppen identifiziert werden können. Anschließend sollte eine Trennmethode mittels HPLC entwickelt werden, um PLA nach unterschiedlichen Endgruppen zu trennen.

---

## 4. Theoretischer Teil

---

### 4.1. Polylactid (PLA)

Polylactid, auch als PLA oder Polymilchsäure genannt, entsteht durch Polymerisation von Milchsäure (2-Hydroxypropionsäure), die wiederum durch Fermentation aus Zucker oder Stärke in Gegenwart von Milchsäurebakterien gebildet wird. Milchsäure ist ein wichtiges Zwischenprodukt im menschlichen und tierischen Stoffwechsel. Aufgrund des stereoaktiven Zentrums kommt Milchsäure in zwei Enantiomeren vor, als L-Milchsäure (rechtsdrehende Milchsäure) oder D-Milchsäure (linksdrehende Milchsäure). Im Säugetier und damit auch den Menschen liegt ausschließlich L-Milchsäure vor, während in Lebensmitteln wie saure Milch, Sauergemüse, Bier und Wein die racemische Mischung aus D- und L-Milchsäure entsteht.

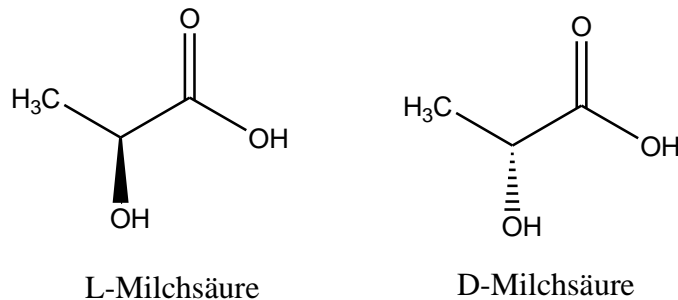


Abbildung 2: Stereoisomere der Milchsäure.

Aus Milchsäure kann Polylactid durch direkte Polykondensation unter der Abspaltung von Wasser hergestellt werden. Da es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, muss das entstehende Wasser möglichst ständig entfernt werden. Aufgrund der Schwierigkeit bei der Wasserentfernung können durch direkte Veresterung nur niedermolekulare Polylactide hergestellt werden. Obwohl einige interessante Forschungsansätze vorhanden sind, um auch hochmolekulare PLAs durch Polykondensation herzustellen, sind diese Technologien bis heute noch nicht verbreitet.<sup>45, 46</sup>

Eine Alternative zur Polykondensation bietet der Umweg über Lactide, die durch ringöffnende Polymerisation zu Polylactiden polymerisiert werden. Der von der Firma Cargill Dow LLC entwickelte Prozess zur Herstellung von PLA im industriellen Maßstab wird in Abbildung 3 schematisch dargestellt.<sup>47, 48</sup> Im ersten Schritt wird Milchsäure zu einem niedermolekularen Prepolymer mit einem Molekulargewicht von ca. 5000 g/mol kondensiert. Anschließend wird das Prepolymer katalytisch zu Lactiden gespalten, welche durch Destillation gereinigt werden. Schließlich werden die Lactide unter Verwendung

geeigneter Katalysatoren zu hochmolekularem PLA umgesetzt. Als Katalysatoren werden hierzu verschiedene Lewis-Säuren oder Metall-Alkoxide verwendet, wobei Zinndiisooctat besonders hohe Aktivität aufweist.<sup>21</sup> Als Initiator können Verbindungen mit freier Hydroxyl-Gruppe wie z.B. Wasser oder Alkohole eingesetzt werden.<sup>7</sup> Hierbei entstehen formell Carbonsäure- oder Alkylester-Endgruppe am initiierten Kettenende. Am anderen Kettenende resultiert eine Alkohol-Endgruppe. In manchen Fällen wird sie verethert oder verestert<sup>24, 32</sup> (End-capping), da die Proben dadurch eine höhere thermische und hydrolytische Stabilität aufweisen.<sup>32, 49</sup>

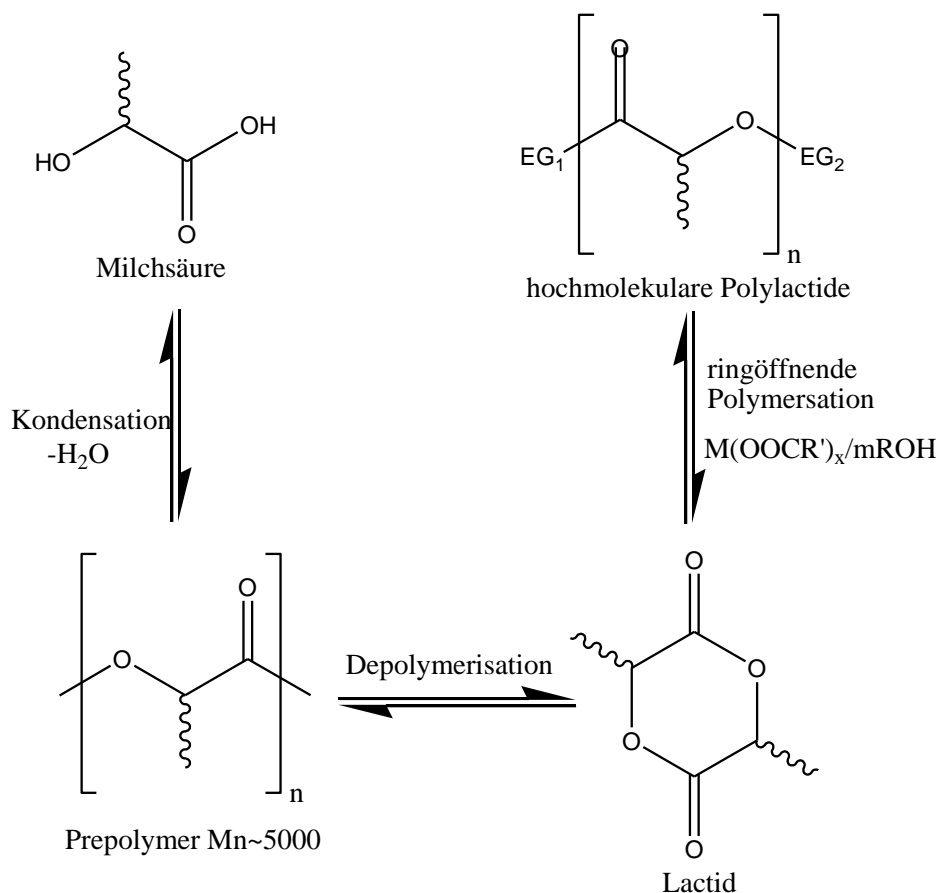


Abbildung 3: Herstellung von PLA über Prepolymer und Lactide nach NatureWorks.

Je nach der stereochemischen Zusammensetzung der als Monomer verwendeten Lactidmischungen entstehen Polylactide unterschiedlicher stereochemischer Zusammensetzung. Diese hat einen erheblichen Einfluss auf die Materialeigenschaften wie z.B. Schmelzpunkt, Kristallinität, Löslichkeit und biologische Abbaubarkeit.<sup>5</sup> Zum Beispiel sind isotaktische Polylactide wie Poly(L-Lactid) (PLLA) und Poly(D-Lactid) (PDLA) teilkristallin, während die racemische D,L-Mischung PDLLA völlig amorph ist.

## 4.2. Polyhydroxybutyrat (PHB)

Das Biopolymer Polyhydroxybutyrat (andere Bezeichnungen: *Polyhydroxybuttersäure*, *PHB*, *Poly-(R)-3-hydroxybutyrat*) ist ein natürlicher Polyester, der thermoplastische Eigenschaften hat. PHB ist das am weitesten verbreitete und am ersten industriell hergestellte Mitglied der Stoffklasse der Polyhydroxyalkanoate (PHA).

PHB wird von Bakterien als Energiespeicher produziert, der in Abwesenheit anderer Energiequellen metabolisiert wird. In vielen Mikroorganismen wie z.B. *Cupriavidus necator* und *Bacillus megaterium* wird PHB bis zu 80 % des Zellgewichtes angereichert.<sup>50</sup>

Industriell wird PHB überwiegend fermentativ in drei Schritten hergestellt, wobei drei Enzyme,  $\beta$ -Ketothiolase, Acetoacetyl-CoA-Reduktase und PHB-Polymerase beteiligt sind. Zuerst werden zwei Acetyl-Coenzym A-Moleküle (Acetyl-CoA) zu Acetoacetyl-CoA kondensiert, welches dann zur R-3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert wird. Anschließend wird R-3-Hydroxybutyryl-CoA zu PHB polymerisiert.<sup>51</sup>

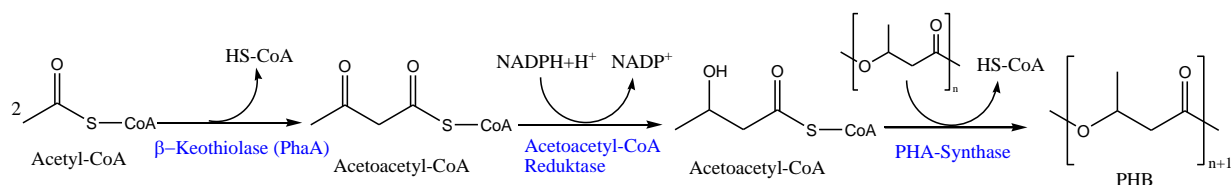


Abbildung 4: Fermentative Herstellung von PHB.

## 4.3. Grundlagen der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

GC-MS, oder auch GC/MS oder GCMS, ist die Abkürzung für die Kopplung der Gaschromatographie (GC) mit einem Massenspektrometer (MS). Hierbei werden die zu analysierenden Substanzen zunächst gaschromatographisch in ihre Bestandteile aufgetrennt, welche anschließend durch ein Massenspektrometer detektiert und identifiziert werden. Durch die Verwendung einer massenspektrometrischen Detektion ist somit sowohl der Nachweis bekannter Verbindungen als auch eine Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen möglich. Mittels GC-MS können qualitative und gegebenenfalls auch quantitative Aussagen über die Proben erhalten werden.

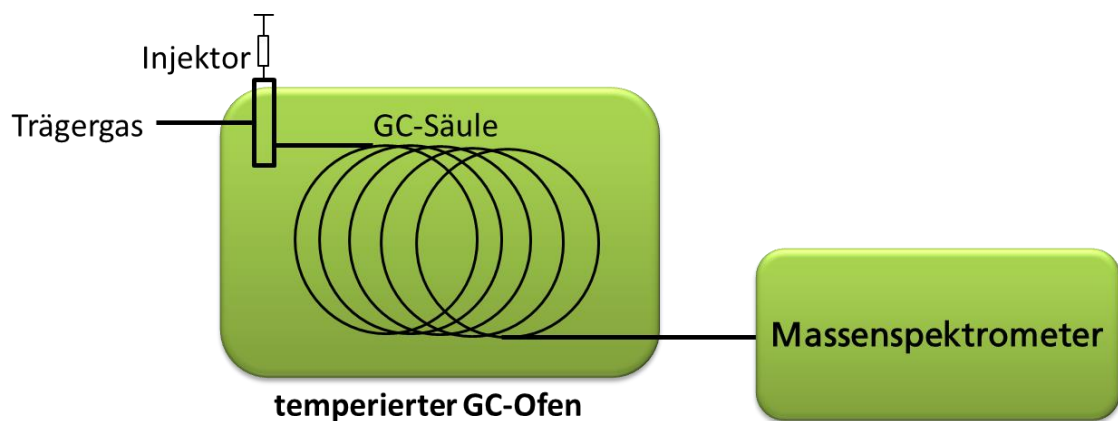


Abbildung 5: Schematische Darstellung der GC/MS.

#### 4.3.1. Gaschromatographie

Die Gaschromatographie ist eine chromatographische Trennmethode, die flüchtige oder ohne Zersetzung bei höheren Temperaturen verdampfbare Verbindungen analysieren kann. Im Vergleich zu anderen chromatographischen Analysetechniken stellt GC hinsichtlich der Messempfindlichkeit, Auflösung der Trennung und Präzision ein besonders leistungsfähiges Verfahren dar.

Ein Gaschromatograph besteht in der Regel aus drei wichtigsten Komponenten: dem Probenaufgabeteil (Injektor), der Trennsäule, die sich in einem Ofen befindet, und dem Detektor. Die Probe wird, gelöst in einem leicht verdampfbaren Lösungsmittel, in den Injektor durch ein Septum eingespritzt. Der Injektor wird in der Regel beheizt, um die Probe zu verdampfen. Anschließend wird die Probe mit einem inerten Trärgas wie z.B. Stickstoff oder Helium vermischt, und durch den Trärgasstrom auf die GC-Säule transportiert, die sich im GC-Ofen befindet und durch einen Temperaturprogramm beheizt werden kann. Innerhalb der Säule werden die unterschiedlichen Komponenten entsprechend ihrer Siedepunkte oder der Affinität zur stationären Phase getrennt und gelangen am Ende der GC-Säule in den Detektor, wie z.B. einen Massenspektrometer oder einen Flammenionisationsdetektor (FID), wo die getrennten Komponenten detektiert werden. Je nach verwendetem Detektor können die Probenbestandteile qualitativ oder quantitativ charakterisiert werden.

Die Trennung in der GC beruht auf der Verteilung der zu trennenden Komponenten zwischen der stationären Phase und der mobilen Phase.<sup>52</sup> Die stationäre Phase befindet sich als durchgehender und gleichmäßiger Film mit einer Dicke von ca. 0.05 bis 0.5  $\mu\text{m}$  auf der Innenwand der GC-Säule, die in der Regel aus Metall- oder Quarzrohr hergestellt wird, eine

---

Länge von 10 bis 200 Metern und einen Durchmesser von ca. 0.25 bis 0.5 mm aufweist. Als mobile Phase dient das Trägergas, das die GC-Säule durchströmt. Die gängigsten Säulenbeschichtungen bestehen aus Polysiloxanen, die durch geeignete Substituenten wie Methyl-, Phenyl- oder Vinyl-Gruppen in ihrer Polarität modifiziert werden. Hierdurch stehen für unterschiedlichste Applikationen eine große Anzahl an stationären Phasen zur Verfügung.<sup>52, 53</sup> Neben den polaren Wechselwirkungen des Analyten mit der stationären Phase spielt die Temperatur eine entscheidende Rolle für die Trennung. Durch Veränderung der Temperatur können einerseits die polare Wechselwirkung der Analyten mit der Säule, andererseits der Dampfdruck des Analyten und damit dessen Löslichkeit in der mobilen Phase gesteuert werden. Bei einer unpolaren Trägersäule, auf welcher die Analyten keine spezifischen Wechselwirkungen mit der stationären Phase ausweisen, erfolgt die Auftrennung ausschließlich aufgrund der unterschiedlichen Siedepunkte der in der Probe vorhandenen Substanzen.

#### **4.3.2. Massenspektrometrie**

Die Massenspektrometrie ist eine Analystechnik zur Bestimmung der Masse von Atomen und Molekülen. Ein Massenspektrometer besteht grundsätzlich aus drei Abschnitten, einer Ionenquelle, die gasförmige Ionen erzeugt, einem Analysator, der die Ionen nach Massen-zu-Ladungs-Verhältnis  $m/z$  auftrennt, und einem Detektor.<sup>54</sup>

Das am häufigsten verwendete Verfahren zur Ionisation der Analytmoleküle ist die Elektronenstoßionisation (EI, *Electron Impact*), die auch in dem in dieser Arbeit verwendeten GC-MS-System eingesetzt wird. Bei der Ionenstoßionisation werden die Moleküle mit Elektronen beschossen, wodurch Elektronen aus der Elektronenwolke der Moleküle herausgeschlagen werden und Radikalkationen ( $M^{\bullet+}$ ) entstehen. Da in der Regel zur Erzeugung der Elektronen eine Energie von 70 eV verwendet wird, die damit viel höher ist als die für die Ionisation benötigte Energie, führt die überschüssige Energie im Allgemeinen zur Fragmentierung der Analytmoleküle.<sup>55</sup> Die entstehenden Fragmente sind für jede Substanz sehr spezifisch und können daher zur Identifizierung der Strukturen herangezogen werden.

Nach der Ionisation gelangen die Ionen in den Analysator, wo sie entsprechend ihrem Massen-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) getrennt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Quadrupol-Analysator verwendet. Er besteht aus vier im Quadrat parallel angeordneten Metallstäben, die als Elektroden dienen.<sup>56</sup> An die Elektroden wird eine Gleichspannung mit einer überlagerten Wechselspannung in der Weise angelegt, dass gegenüberliegende Stäbe



dieselbe und nebeneinander liegende die entgegengesetzte Polarität besitzen. Beim Passieren des Quadrupolfeldes werden die Ionen durch die beiden Spannungen in eine spiralförmige Flugbahn gebracht. Der Radius der Flugbahn ist dabei abhängig vom  $m/z$ -Verhältnis des Ions. Ist dieses zu groß, gelangen die Ionen an die Elektroden und werden dort entladen. Durch Variation der Gleich- und Wechselspannungen ist es daher möglich, dass nur Ionen mit genau einem bestimmten  $m/z$ -Verhältnis die Stäbe passieren und zum Detektor gelangen können.<sup>57</sup>

Als Detektor werden häufig Elektronenvervielfacher (EM, *Electron Multiplier*) unterschiedlicher Formen eingesetzt. Hierbei treffen die Ionen eine Beschichtung (Konversionsdynode) und schlagen aus diese Elektronen heraus. Die erzeugten Elektronen werden zu einer Dynode beschleunigt und setzen dort weitere Elektronen frei. Dieser Vorgang wiederholt sich, und es kommt zu einer kaskadenartigen Annahme der Elektronenzahl, wodurch ein Strom gemessen werden kann.<sup>58</sup>

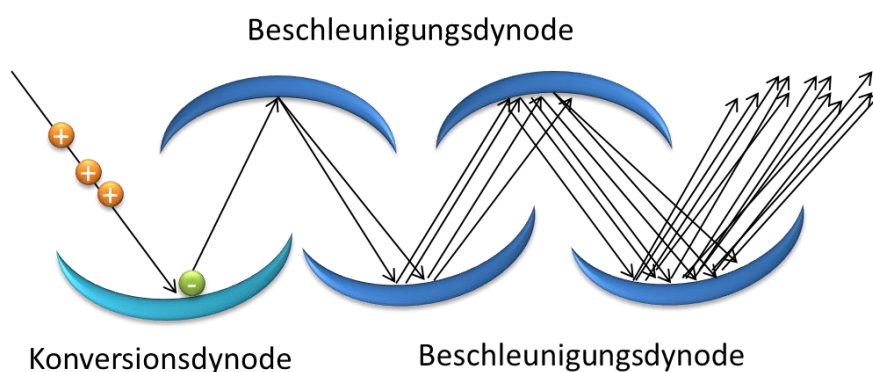


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Elektronenverstärkung in einem Elektronenvervielfacher.

Zur Auswertung der Massenspektren kann entweder der Totalionenstrom (TIC, *Total Ion Current*), in dem die Summe aller detektierten Massenspuren enthalten ist, oder der Ionenchromatogramm von einer einzelnen Massenspur (SIM, *Single Ion Monitoring*) betrachtet werden. Für eine quantitative Auswertung ist die Betrachtung des SIM vorteilhaft, da die Einflüsse durch Hintergrundrauschen oder Peaküberlagerung entfallen. Hierbei soll die Massenspur ausgewählt werden, die selektiv für die auszuwertende Substanz ist und möglichst hohe Intensität aufweist.

#### 4.3.3. Pyrolyse-GC-MS

Wie oben erwähnt, ist die Anwendung der GC-MS auf Substanzen beschränkt, die ohne Zersetzung verdampfbar sind. Bei nichtflüchtigen Substanzen, wie z.B. Polymere, bietet die Kombination der Pyrolyse mit der GC-MS die Möglichkeit, solche Substanzen dennoch zu analysieren. Bei der Pyrolyse-GC-MS werden die Proben zuerst in einem Pyrolysator bei einer hohen Temperatur von ca. 400-1000 °C thermisch gespalten, wodurch verdampfbare Fragmente entstehen, die anschließend mittels GC-MS untersucht werden können.

#### 4.4. Grundlagen der MALDI-TOF-Massenspektroskopie

Die MALDI-TOF-Massenspektroskopie (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight – Mass Spectroscopy*) ist eine Art der Massenspektrometrie, die sich zur Untersuchung von Proben höherer Molmassen eignet. Wie alle anderen Massenspektrometer besteht ein MALDI-TOF-Massenspektrometer auch aus der Ionenquelle, dem Analysator und dem Detektor. Im Unterschied zur Elektronenstoßionisation und dem Quadrupol-Analysator, die im Kap. 4.3.2 beschrieben werden, werden die Moleküle in MALDI-TOF-MS durch eine Matrix-unterstützte Laserdesorption ionisiert und die Ionen mittels eines Flugrohrzeitanalysators getrennt.<sup>59</sup> MALDI-TOF-MS ist tolerant gegenüber Verunreinigungen und es lassen sich Moleküle mit dem Molekulargewicht bis zu 1.5 M Da untersuchen.<sup>60</sup>

In der MALDI-TOF-MS wird der Analyt meist in Lösung mit einem Adduktbildner wie z.B. Lithiumchlorid (LiCl) und einem großen Überschuss einer Matrix gemischt, auf einen metallischen Probenträger getropft und dort getrocknet.<sup>61</sup> Als Matrix werden in der Regel polare aromatische Substanzen verwendet, die durch UV- oder Infrarot-Strahlung angeregt werden können<sup>62-64</sup> (siehe Abbildung 7). In dieser Arbeit wurde Dithranol (1,8-Dihydroxy-9(10H)-anthracenon) als Matrix eingesetzt.

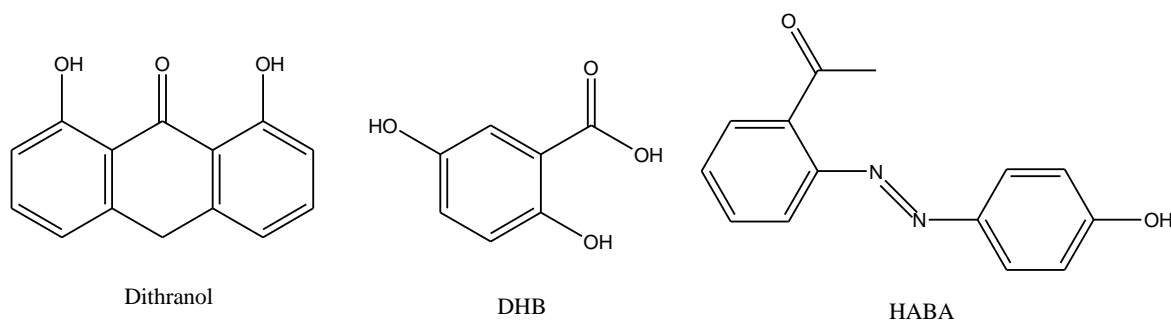


Abbildung 7: Auswahl typischer Matrices für die MALDI-TOF-MS.

---

Die Probe auf dem Proben­träger wird im Hochvakuum einem kurzzeitigen, intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung ausgesetzt, wobei die Laserenergie von der Matrix absorbiert und in thermische Energie umgewandelt wird. Durch die schnelle Aufheizung werden die Moleküle explosionsartig in die Gasphase desorbiert. Bei diesem Phasenübergang werden die Analytmoleküle mitgerissen und durch den Addukt­bildner ionisiert. Für die Ionisation werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Eine abschließende Klärung steht jedoch noch aus.<sup>65, 66</sup> Im Vergleich zu Elektronenstoßionisation oder anderen Ionisationsmethoden kann bei MALDI die Energie durch Laserpulse kontrolliert und effizient zugeführt werden, daher können die Analytmoleküle von einer überschüssigen Energie, die zur Fragmentierung führen kann, geschützt werden.<sup>42</sup> Aufgrund der schonenden Ionisation hat die MALDI-TOF-MS insbesondere bei der Charakterisierung von Makromolekülen wie z.B. Proteinen große Anwendung erfahren.

Die entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld auf eine kinetische Energie von einigen keV beschleunigt und driften über eine feldfreie Flugstrecke von etwa 1-2 Metern. Die Flugzeit ist nach folgender Gleichung abhängig vom m/z-Verhältnis<sup>67</sup>:

$$\frac{m}{z} = \frac{2 \cdot e \cdot U}{L^2} \cdot t^2 \quad \text{Gleichung 1}$$

(e = Elementarladung, U = Beschleunigungsspannung, L = Länge der Driftstrecke, t = Flugzeit in der Driftstrecke).

Aus der Gleichung kann man sehen, dass das Quadrat der Flugzeit proportional zu m/z ist, d.h. die schwereren Ionen erreichen den Detektor später als die leichten Ionen.

Da in der Laserdesorption nicht alle Ionen zur gleichen Zeit am gleichen Ort desorbiert und ionisiert werden, ergibt sich eine Zeitverzögerung, wodurch nicht alle Ionen gleicher Masse zum exakt gleichen Zeitpunkt zum Detektor gelangen. Dies verursacht eine Signalverbreiterung und damit eine verringerte Massenauflösung. Zur Kompensation der Energieverteilung der Ionen kann ein elektrostatischer Ionenspiegel, Reflektor genannt, verwendet werden. Energiereichere Ionen driften tiefer in das Bremsfeld des Reflektors ein, durchlaufen dadurch einen längeren Weg im Reflektor und werden somit von den energieärmeren Ionen gleichen m/z-Verhältnisses eingeholt, wodurch sie nahezu gleichzeitig detektiert werden (s. Abbildung 8).

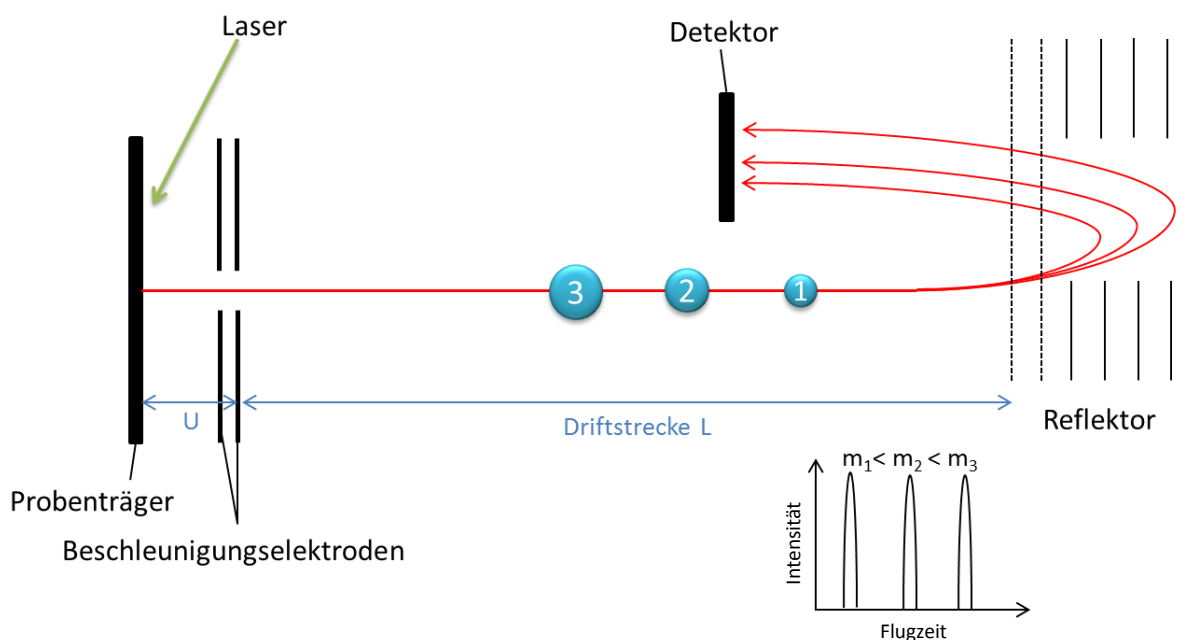


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers.

In der Polymerchemie kann MALDI-TOF-MS verwendet werden, um Molekulargewichtsverteilung zu bestimmen.<sup>59</sup> Jedoch können in der Regel nur niedermolekulare Proben mit den Molmassen bis zu etwa 10 000 Da untersucht werden. Die Schwierigkeit bei der Untersuchung von Polymeren höherer Molekulargewichte sind sowohl auf die Einschränkung der Instrumente als auch auf den MALDI-Prozess selbst zurückzuführen.<sup>60</sup> Einerseits verringert sich die Empfindlichkeit der derzeit verfügbaren Detektoren wie z.B. Elektronenmultiplier bei hochmolekularen Ionen.<sup>68</sup> Andererseits hängt die Effizienz des Desorptions-/Ionisationsprozesses mit dem Molekulargewicht des Analyten zusammen, wobei hochmolekulare Moleküle schwer zu ionisieren sind.<sup>69</sup> Außer vom Molekulargewicht werden die Peakintensitäten auch von der Dispersität beeinflusst. Bei größerer Dispersität verteilen sich die gebildeten Ionen und somit die gesamte Signalintensität auf mehr Peaks, was zu einer verringerten Intensität des einzelnen Massenpeaks führt.

Mittels MALDI-TOF-MS können auch die Endgruppen der Polymere bestimmt werden. Da sich die Peakmolmassen aus den Molmassen der Wiederholungseinheiten, der Endgruppen und des ionenbildenden Kations zusammensetzt, können unter der Annahme von bestimmten Endgruppen die Molmassen der Ketten berechnet und mit den experimentell gefundenen Massen verglichen werden, wodurch Aussagen über Endgruppen getroffen werden können.<sup>70</sup>

---

#### 4.5. Grundlagen der Flüssigchromatographie

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) ist wie die Gaschromatographie eine chromatographische Trennmethode. Im Unterschied zur GC können mittels HPLC auch nichtflüchtige Substanzen analysiert werden.

Wie bei GC beruht der Trennprozess der HPLC auch auf den unterschiedlichen Verteilungen der Analytmoleküle zwischen der stationären und der mobilen Phase. Die Trennsäule ist mit der stationären Phase gefüllt, welche meist ein poröses Material darstellt. Als mobile Phase dient eine Flüssigkeit (auch als Eluent bezeichnet), welche die Säule durchströmt.

Der Trennprozess lässt sich durch ein Verteilungsgleichgewicht beschreiben<sup>71</sup>:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_D \quad \text{Gleichung 2}$$

$$K_D = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) = \exp\left(\frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT}\right) \quad \text{Gleichung 3}$$

$K_D$  ist dabei der Verteilungskoeffizient, der das Konzentrationsverhältnis der gelösten Probe in der stationären und der mobilen Phase beschreibt. Nach Gleichung 2 ist  $K_D$  direkt mit der Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G$  verbunden, welche wiederum aus der entropischen Änderung ( $\Delta S$ ) und der enthalpischen Änderung ( $\Delta H$ ) beim Übergang der Analytmoleküle aus der mobilen Phase in die stationäre Phase besteht. In der klassischen HPLC von niedermolekularen Substanzen basiert die Trennung fast ausschließlich auf enthalpischen Wechselwirkungen. Bei Polymeren hingegen gewinnen aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes entropische Effekte stärker an Bedeutung.

Abhängig von der Wahl der mobilen und stationären Phase sowie der Temperatur können bei Polymeren unterschiedliche chromatographische Modi eingestellt werden<sup>72</sup>:

- Größenausschlusschromatographie (SEC, *Size Exclusion Chromatography*): Eine entropiegesteuerte Trennmethode, die auf den unterschiedlichen hydrodynamischen Volumina der Polymermoleküle in verdünnter Lösung beruht.
- Adsorptionschromatographie (LAC, *Liquid Adsorption Chromatography*): Ein enthalpiegesteuerter Trennmodus, bei welchem die Retentionszeit durch Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und den Struktureinheiten der Polymermoleküle bestimmt wird.
- Chromatographie unter kritischen Bedingungen (LCCC, *Liquid Chromatography under Critical Conditions*): Bei diesem chromatographischen Trennmodus kompensieren sich die entropischen und enthalpischen Effekte, so dass  $\Delta G = 0$  ist.

---

#### 4.5.1. Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die SEC ist die am häufigsten eingesetzte HPLC-Methode zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilungen von Polymeren.

Der Trennmechanismus beruht darauf, dass Moleküle unterschiedlicher hydrodynamischer Volumina unterschiedlich tief in die Poren der stationären Phase eindringen können. Bei der idealen SEC sind die enthalpischen Wechselwirkungen der Polymermoleküle mit der stationären Phase ausgeschlossen ( $\Delta H = 0$ ), somit lässt sich die Gleichung 3 zu folgender Gleichung vereinfachen:

$$K_{SEC} = \exp\left(\frac{\Delta S}{R}\right) \quad \text{Gleichung 4}$$

Da die Makromoleküle in den Poren der stationären Phase nicht mehr alle Konformationen einnehmen können, gilt  $\Delta S \leq 0$  und somit  $0 < K_{SEC} \leq 1$ .

Die Elutionsreihenfolge wird durch das den Molekülen zugängliche Porenvolumen bestimmt. Große Moleküle können nicht so weit in die Poren diffundieren und eluieren zuerst, während kleine Moleküle tiefer in die Poren eindringen können, da länger verweilen und später eluieren. Moleküle unterhalb einer bestimmten Größe können ungehindert ohne Entropieänderung in die Poren eindringen. Somit ist K gleich 1 und man spricht von der totalen Permeation. Für Moleküle, die gänzlich aus den Poren ausgeschlossen werden, spricht man von der Ausschlussgrenze und K ist gleich 0. Zwischen diesen beiden Extremfällen liegt der Trennbereich.

Für das Elutionsvolumen  $V_E$  gilt folgende Gleichung:

$$V_E = V_A + V_p \cdot K_{SEC} \quad \text{Gleichung 5}$$

$V_A$  ist das Zwischenkornvolumen, welches gleich dem Ausschlussvolumen ist.  $V_p$  ist das Porenvolumen der Säule.

Da  $K_{SEC}$  zwischen 0 und 1 liegt, liegt das Elutionsvolumen in der SEC zwischen  $V_A$  und  $V_A + V_p$ .

#### Konventionelle Kalibration

Da die Trennung in der SEC durch das hydrodynamische Volumen des Moleküls in Lösung und nicht durch das Molekulargewicht bedingt ist, wird eine polymerspezifische Kalibrierung benötigt um die Molekulargewichtsverteilung zu ermitteln. Um die Kalibrationskurve zu

---

erstellen, verwendet man oftmals eine Serie engverteilter Polymerstandards, deren Molekulargewichte möglichst genau bekannt sind. Die Polymerstandards mit bekannten Molekulargewichten werden auf die Säule injiziert und die Molekulargewichte der Standards gegen das zugehörige Elutionsvolumen aufgetragen. Durch diese Kalibrationskurve können die experimentell bestimmten Werte für das Elutionsvolumen einer unbekannten Probe mit dem entsprechenden Molekulargewicht korreliert, und die Molekulargewichtsverteilung und die Molekulargewichtsmittelwerte ermittelt werden.

Das hydrodynamische Volumen eines Moleküls in Lösung ist abhängig von den Wechselwirkungen zwischen dem Molekül und dem Lösungsmittel, welche von der chemischen Struktur des Moleküls beeinflusst werden. Deshalb unterscheiden sich die hydrodynamischen Volumina für Polymere unterschiedlicher chemischer Struktur bei gleichem Molekulargewicht. Um die wahre Molekulargewichtsverteilung zu bestimmen, müssen daher die Kalibrationsstandards die gleiche chemische Struktur wie die zu analysierenden Molekülen aufweisen, sonst erhält man nur relative Molekulargewichte.

### Universelle Kalibration

Engverteilte Kalibrationsstandards sind nicht für alle Polymere kommerziell verfügbar. In diesem Fall kann unter bestimmten Voraussetzungen die universelle Kalibration verwendet werden. Nach Benoît ist das hydrodynamische Volumen proportional zum Produkt aus intrinsischer Viskosität  $[\eta]$  und Molekulargewicht  $M$ .<sup>73, 74</sup>

$$V_h \sim [\eta] \cdot M \quad \text{Gleichung 6}$$

Daher gilt für zwei Polymere mit identischem Elutionsvolumen:

$$[\eta]_1 \cdot M_1 \sim [\eta]_2 \cdot M_2 \quad \text{Gleichung 7}$$

Die intrinsischen Viskositäten  $[\eta]_1$  und  $[\eta]_2$  können z.B. dadurch bestimmt werden, dass die SEC mit einem Viskositätsdetektor gekoppelt wird. Bei Kenntnis von  $[\eta]_1$ ,  $[\eta]_2$  bei einem bestimmten Elutionsvolumen und dem Molekulargewicht des Polymers 1 ( $M_1$ ) kann das Molekulargewicht des Analyten 2 ( $M_2$ ) berechnet werden. Falls kein Viskositätsdetektor zur Verfügung steht, können die intrinsischen Viskositäten über die Kuhn-Mark-Houwink-Sakurada-Beziehung berechnet werden:

$$[\eta] = KM^a$$

Gleichung 8

K und a sind hierbei die Mark-Houwink-Parameter und -Exponent des betrachteten Polymeren in dem betrachteten Lösungsmittel, welche für viele Polymer/Lösungsmittelsystemen bekannt sind.

Durch Einsetzen der Gleichung 8 in Gleichung 7 folgt:

$$M_2 = \left( \frac{K_1 M_1^{a_1+1}}{K_2} \right)^{\frac{1}{a_2+1}}$$

Gleichung 9

Liegt somit eine Kalibrationskurve basierend auf engverteilten Standards ( $M_1$ ) vor, kann bei Kenntnis der Mark-Houwink-Parameter die Molmasse der zu analysierenden Probe bei gleichem Elutionsvolumen  $M_2$  berechnet werden.

### Breite Kalibration

Für Polymere, für welche weder geeignete Standards kommerziell verfügbar, noch deren Mark-Houwink-Parameter bekannt sind, bietet die Kalibration mit breitverteilten Proben bekannter mittlerer Molekulargewichte eine Möglichkeit um dennoch Kalibrationskurven zu erstellen<sup>72, 75, 76</sup>. Hierfür wird zunächst eine Kalibrierkurve mit engverteilten Standards beliebiger chemischer Struktur erstellt. Anschließend werden unter den gleichen chromatographischen Bedingungen die Chromatogramme von mindestens zwei breitverteilten Proben mit der gleichen chemischen Struktur wie der des Analyten ermittelt. Von diesen Proben müssen  $M_w$  und/oder  $M_n$  möglichst genau bekannt sein. Aus den Chromatogrammen und der Kalibrationskurve der Kalibranten kann eine Kalibrationskurve für die breiten Proben berechnet werden.

Hierzu geht man wie folgt vor: Unter der Annahme der Gültigkeit der universellen Kalibration und durch Umformen der Gleichung 7 und Gleichung 8 lässt sich der Zusammenhang zwischen der unbekannten Kalibrationskurve des Analyten (2) und der bekannten Kalibrationskurve des Kalibranten (1) wie folgt darstellen:

$$\log M_2 = \frac{1}{1+a_2} \log \frac{K_1}{K_2} + \frac{1+a_1}{1+a_2} \log M_1$$

Gleichung 10



---

Diese Gleichung lässt sich schreiben als:

$$\log M_2 = A + B \log M_1$$

Gleichung 11

$$\text{mit } A = \left( \frac{K_1}{K_2} \right)^{\frac{1}{1+a_2}}, B = \frac{1+a_1}{1+a_2}$$

Hierbei stellen A und B justierbare Parameter dar, welche von den Mark-Houwink-Parametern des Analyten und des Kalibranten abhängen. Veränderungen von A bzw. B bewirken eine Parallelverschiebung bzw. Drehung der Kalibrationskurve für  $M_2$  (siehe Abbildung 9). Unter einer Annahme für die bislang noch unbekannten A- und B-Werte wird zuerst eine Testkalibrationskurve nach Gleichung 11 berechnet. Werden die Chromatogramme der breiverteilen Proben gegen diese Testkalibrationskurve ausgewertet, erhält man Testwerte für die mittleren Molekulargewichte, welche von der Wahl der Parameter A und B abhängen und mit den bekannten wahren Molekulargewichtsmittelwerten verglichen können. Die Parameter A- und B-Werte werden nun systematisch variiert, bis eine bestmögliche Übereinstimmung der Testmittelwerte mit den wahren Molekulargewichtsmittelwerten erreicht wird. Aus den so ermittelten optimalen A- und B-Werten kann nun die Kalibrationskurve des Analyten aus der des Kalibranten berechnet und für die Kalibration weiterer Analytproben verwendet werden.<sup>75, 76</sup>

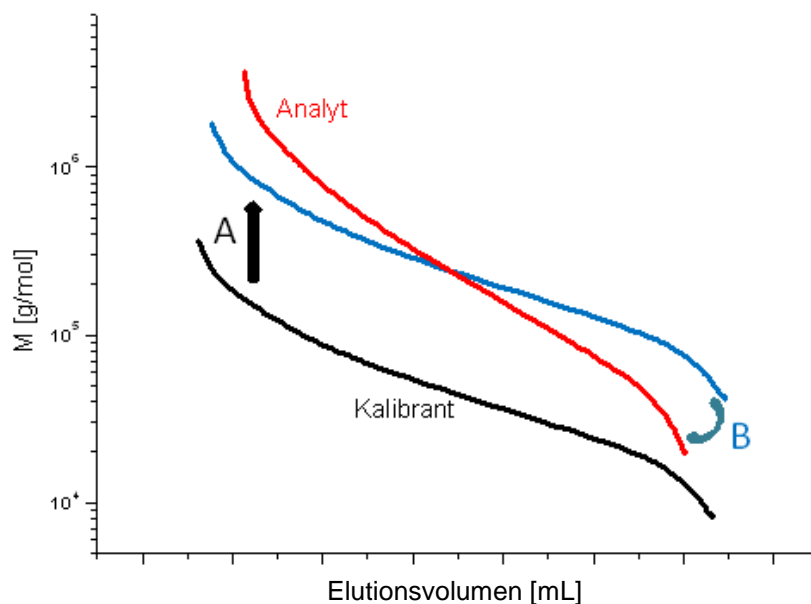


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Kalibration mit breit verteilten Proben. Schwarz: Kalibrationskurve des Kalibranten 1, rot: angepasste Kalibrationskurve für die Analyt 2.

### Integrale Kalibration

Neben der breiten Kalibration bietet noch eine weitere Methode, die integrale Kalibration, die Möglichkeit, Kalibrationskurven unter Verwendung von breit verteilten Proben zu erstellen.<sup>72</sup> Hierfür wird mindestens eine breitverteilte Probe mit bekannter Molekulargewichtsverteilung und der gleichen chemischen Struktur wie der des Analyten benötigt.

Das Prinzip der durchgeführten integralen Kalibration wird in der Abbildung 10 schematisch dargestellt. Zunächst wird die integrale (kumulative) Massenverteilung,  $I(M)$ , nach Gleichung 12 berechnet, die den Massenanteil der Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als  $M$  wiedergibt.

$$I(M) = \int_0^M w(M) dM \quad \text{Gleichung 12}$$

Dann wird die Kalibrationsprobe unter den gleichen chromatographischen Bedingungen wie der Analyt vermessen. Aus dem Chromatogramm der Kalibrationsprobe kann die integrale Flächenverteilung  $I(V_e)$  berechnet werden als:

$$I(V_e) = \frac{\int_{V_e(M)}^{\infty} S(V_e) dV_e}{\int_0^{\infty} S(V_e) dV_e} \quad \text{Gleichung 13}$$

$V_e(M)$  bedeutet das Elutionsvolumen der Moleküle mit dem gewählten Molekulargewicht  $M$ .  $I(V_e)$  gibt den Flächenanteil der Moleküle wieder, die ein Elutionsvolumen größer als  $V_e(M)$  haben. Wenn die Moleküle ein Elutionsvolumen größer als  $V_e(M)$  besitzen, müssen sie bei Vorliegen eines SEC-Mechanismus ein kleineres Molekulargewicht als  $M$  aufweisen. Wenn der Detektor konzentrationsabhängig ist, d.h. das Detektorsignal proportional zur Probenkonzentration ist, gilt  $I(M)$  gleich  $I(V_e)$ . So erhält man eine Abhängigkeit zwischen Molekulargewicht und Elutionsvolumen, wodurch eine Kalibrationskurve resultiert.

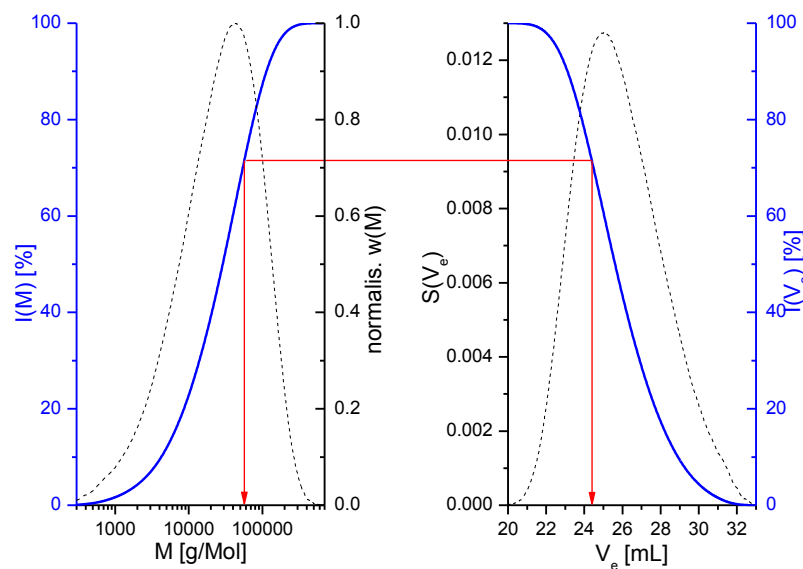


Abbildung 10: Schematische Darstellung der integralen Kalibration.

### Statische Lichtstreuung

Um ohne eine Kalibration absolute Molekulargewichte zu bestimmen können molmassensensitive Detektoren wie z.B. Lichtstreudetektoren in der SEC verwendet werden. Durch Kopplung eines Konzentrationsdetektors mit einem Lichtstreudetektor werden sowohl die Probenkonzentration als auch das Molekulargewicht zu jedem Elutionsvolumen bestimmt, wodurch die wahre Molekulargewichtsverteilung sowie die Molekulargewichtsmittelwerte ermittelt werden können.

Es gibt verschiedene Typen der Lichtstreuendetektoren wie z.B. LALLS (Kleinwinkellichtstreuung), RALLS (Rechtwinkellichtstreuung) und MALLS (Multiwinkellichtstreuung). Im Vergleich zu LALLS und RALLS kann MALLS-Detektor große Molekulargewichte messen und Informationen über Trägheitsradien und Molekülstrukturen liefern.<sup>77</sup>

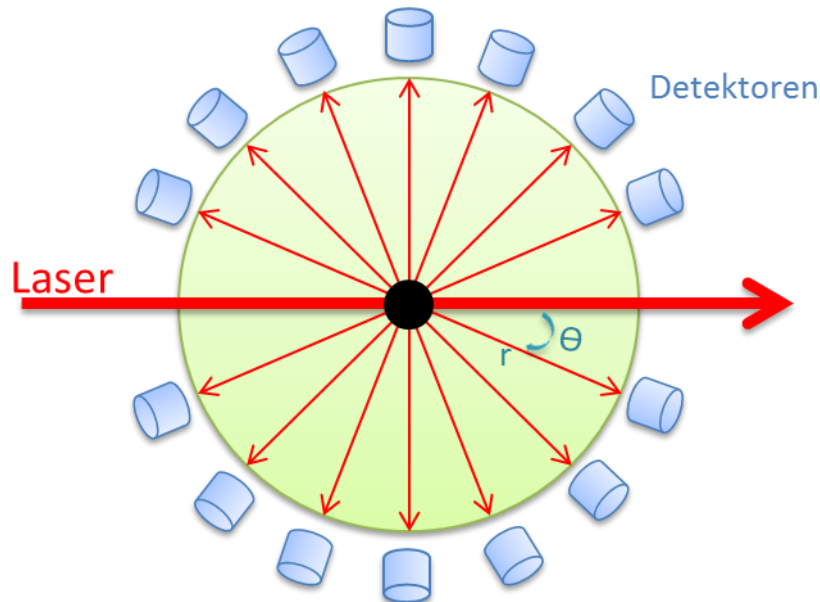


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines MALLS-Detektors.

Ein SEC-MALLS-Detektor beinhaltet eine Zelle, durch welche das Eluat nach der Trennung in der SEC-Säule fließt. Die in der Zelle befindliche Probe wird mit einem Laser einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt, wobei das Licht durch die Polymermoleküle gestreut wird. Aus der Intensität des eingestrahlichten Lichtes  $I_0$  und des Streulichtes  $I_\theta$  beim Streuwinkel  $\theta$  kann das Rayleigh-Verhältnis nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$R(\theta) = \frac{I_\theta r^2}{I_0 V_0} \quad \text{Gleichung 14}$$

wobei  $r$  der Abstand zwischen Streuzentrum und Detektor ist und  $V_0$  das vom Detektor erfasste Streuvolumen bedeutet. Die Abhängigkeit des Rayleigh-Verhältnisses vom Molekulargewicht lässt sich durch folgende Gleichung<sup>72, 78</sup> beschreiben:

$$\frac{R(\theta)}{K \cdot c} = M \cdot P(\theta) \cdot (1 - 2A_2 \cdot c \cdot M \cdot P(\theta) + \dots) \quad \text{Gleichung 15}$$

mit

$$K = 4\pi^2 \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 \frac{n_0^2}{N_A \cdot \lambda_0^4}$$

optische Konstante

$\lambda_0$

Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes im Vakuum

$dn/dc$

Brechungsindexinkrement des Polymers

$n_0$

Brechungsindex des Lösungsmittels

$c$

Konzentration des Polymers

$M$

Molekulargewicht des Polymers

$$P(\theta) = 1 - q^2 \frac{R_g^2}{3}$$

Formfaktor

$$q \approx \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Streufaktor für statistische Knäuel

$R_g$

Trägheitsradius

$A_2$

zweiter Virialkoeffizient

Der Formfaktor  $P(\theta)$  beschreibt die Winkelabhängigkeit der Streuintensität. Für kleine Moleküle mit  $R_g \leq \lambda/20$  kann  $P(\theta)$  als 1 approximiert werden, während er bei großen Molekülen vom Streuwinkel abhängig ist. Durch die Winkelabhängigkeit des Streulichtes kann der Trägheitsradius  $R_g$  bestimmt werden.

Bei sehr kleinen Konzentrationen, wie sie nach der Trennung in der SEC vorliegen, kann der zweite Term  $2A_2 \cdot c$  in Gleichung 15 vernachlässigt werden.

Durch Extrapolation der Winkelabhängigkeit kann das Molekulargewicht nach folgender Gleichung ermittelt werden<sup>79</sup>:

$$\lim_{\substack{\theta \rightarrow 0 \\ c \rightarrow 0}} \frac{K \cdot c}{R(\theta)} = \frac{1}{M} \quad \text{Gleichung 16}$$

Um die Konzentration  $c$  zu bestimmen, wird der Lichtstredetektor mit einem Konzentrationsdetektor, meistens einem Brechungsindexdetektor (RI) gekoppelt.

#### 4.5.2. Adsorptionschromatographie (IAC)

Im Gegensatz zur SEC, bei der die Trennung auf Entropieänderungen beim Übergang der Probenmoleküle aus der freien Lösung in die Pore resultiert, basiert in der Adsorptionschromatographie die Trennung auf enthalpischen Wechselwirkungen der

---

Polymermoleküle mit der stationären Phase. Im Idealfall wird die Entropieänderung  $\Delta S$  als 0 angenommen. Somit ergibt sich aus Gleichung 3:

$$K_{LAC} = \exp\left(-\frac{\Delta H}{RT}\right) \quad \text{Gleichung 17}$$

Für einen adsorptiven Prozess ist  $\Delta H$  negativ, daher gilt  $K_{LAC} > 1$ .

Um die enthalpischen Wechselwirkungen der Moleküle mit der stationären Phase zu fördern, sollte ein schwacher Eluent verwendet werden. Starke Eluenten verhindern die Wechselwirkungen und werden in der SEC verwendet.

Im realen Fall ist  $\Delta S = 0$  nie gegeben, wodurch entropische Effekte auch bei der Adsorptionschromatographie berücksichtigt werden müssen. Für das Elutionsvolumen gilt:

$$V_E = V_A + V_p \cdot K_{SEC} + K_{LAC} \cdot V_{stat} \quad \text{Gleichung 18}$$

$V_{stat}$  ist das für die Trennung (aufgrund der Adsorption) zugängliche Volumen der stationären Phase.

Im Fall von Homopolymeren steigt mit dem Molekulargewicht die Anzahl der wechselwirkenden Gruppen und somit die Stärke der Adsorption. Daher werden in der LAC Moleküle mit größerem Molekulargewicht stärker adsorbiert als solche mit niedrigerem Molekulargewicht. Die Adsorptionsstärke einer Wiederholungseinheit hängt dabei von der chemischen Struktur ab. Daher beeinflusst in der LAC neben dem Molekulargewicht auch die Art und die chemische Zusammensetzung des Polymeren das Elutionsvolumen. Durch Wahl der stationären Phase, des Eluenten und der Temperatur kann die Wechselwirkungsstärke gezielt eingestellt werden.

Die meisten enthalpischen Wechselwirkungen können in drei Klassen eingeordnet werden, nämlich unpolare und polare Wechselwirkungen sowie Ionenaustausch.<sup>80</sup>

Bei unpolaren Wechselwirkungen werden die Analytmoleküle aufgrund Van-der-Waals- oder London-Kräfte (Dispersionskräfte) auf der stationären Phase adsorbiert. Häufig eingesetzte stationäre Phasen sind mit Alkylketten wie z.B. Octadecyl-Kette (C18) modifizierte Kieselgelphasen. Auch polymerbasierte Materialien wie z.B. Polystyrol-co-divinylbenzol (SDV) können verwendet werden.

Die polaren Wechselwirkungen umfassen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkung. Hierbei werden

---

typischerweise unmodifizierte oder mit Nitro-, Amin- oder Diol-Gruppen modifizierte Kieselgele als stationäre Phase herangezogen.

Beim Ionenaustausch ist die Coulomb'sche Wechselwirkung, oder auch als elektrostatische Wechselwirkung genannt, für die Adsorption verantwortlich.

#### **4.5.3. Chromatographie unter kritischen Bedingungen (LCCC)**

Im Übergangsbereich zwischen SEC und LAC liegt ein enger Bereich, bei dem sich entropische und enthalpische Wechselwirkungen gerade kompensieren. Chromatographie unter diesen Bedingungen wird als Chromatographie unter kritischen Bedingungen (LCCC) bezeichnet. Durch die Kompensation der Enthalpie und Entropiebeiträge gilt ( $\Delta H = T \cdot \Delta S$ ) und somit:

$$K_D = \exp\left(\frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT}\right) = 1 \quad \text{Gleichung 19}$$

Bei der LCCC eluieren Homopolymere identischer chemischer Struktur unabhängig von ihrer Molekülgröße bzw. von dem Molekulargewicht beim gleichen Elutionsvolumen. Da die Wiederholungseinheiten keinen Beitrag mehr zur Retention liefern, werden sie oftmals als chromatographisch „unsichtbar“ bezeichnet. Unter diesen Bedingungen werden Trennungen nach unterschiedlichen funktionellen Endgruppen möglich. Mittels LCCC können auch komplexe Polymerblends oder Blockcopolymere von Homopolymeren getrennt werden.

Zur Bestimmung der kritischen Bedingungen für ein bestimmtes Homopolymer auf einer gewählten stationären Phase wird bei einer definierten Temperatur die Eluentenzusammensetzung so eingestellt, dass Homopolymere unterschiedlicher Molmassen bei gleichem Elutionvolumen eluieren. Die kritischen Bedingungen reagieren sehr empfindlich auf geringste Änderung der Eluentenzusammensetzung oder die Temperatur.

#### **4.5.4. Gradientenchromatographie**

Wird eine Probe bei der Chromatographie unter isokratischen Bedingungen aufgrund sehr starker Wechselwirkungen vollständig oder teilweise auf der stationären Phase adsorbiert und nicht mehr von der Säule eluiert, kann die Gradientenchromatographie herangezogen werden. Hierbei werden die Eluentenzusammensetzung und damit die Eluentenstärke während des chromatographischen Experimentes systematisch verändert. Üblicherweise

beginnt man mit einem schwachen Eluenten, wodurch die Polymermoleküle auf der Säule adsorbiert werden. Durch Erhöhung des Anteils an starkem Eluenten werden die Proben von der stationären Phase desorbiert und von der Säule eluiert.

In der Gradientenchromatographie steigt das Elutionsvolumen mit dem Molekulargewicht an. Jedoch ist die Molekulargewichtsabhängigkeit nur für niedrige Molekulargewichte stark ausgeprägt. Mit steigendem Molekulargewicht nimmt der Molekulargewichtseinfluss ab, bis die Polymere unabhängig von der Molmasse bei nahezu gleichem Elutionsvolumen eluieren (s. Abbildung 12). Die Eluentenzusammensetzung zum Zeitpunkt der Elution hochmolekularer Proben liegt dabei nahe der kritischen Eluentenzusammensetzung.<sup>81, 82</sup>

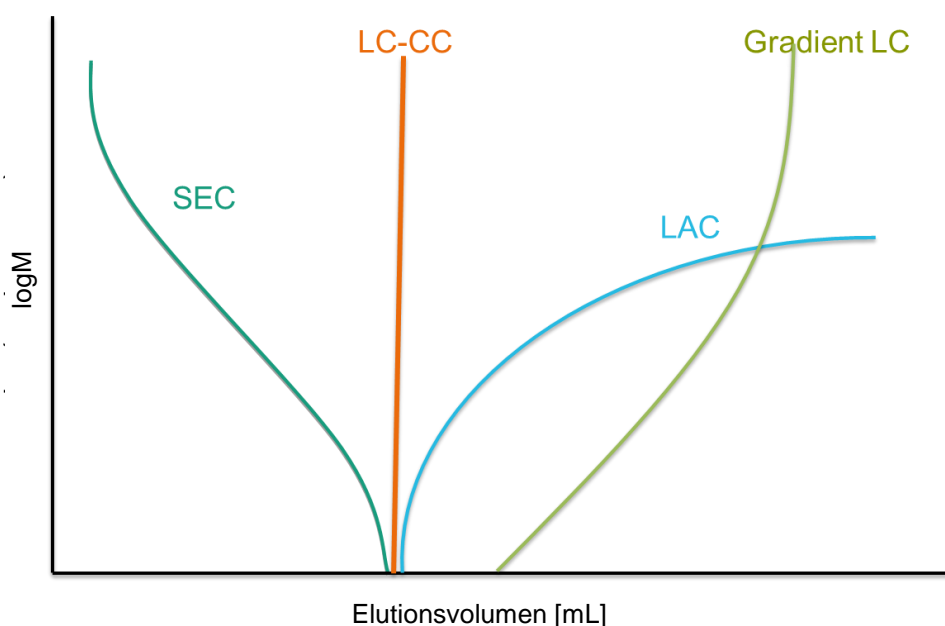


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Molekulargewichtsabhängigkeit vom Elutionsvolumen in den verschiedenen chromatographischen Modi.<sup>[21]</sup>

#### 4.6. Grundlage der Festphasenextraktion (SPE)

Die Festphasenextraktion (*Solid Phase Extraction*) ist eine leistungsstarke Methode zur Probenvorbereitung, die Anwendungen in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik, sowie bei pharmazeutischen und biochemischen Analysen findet.

Das Prinzip der SPE basiert wie bei allen chromatographischen Methoden auf der reversiblen Wechselwirkung des Analyten mit stationärer und mobiler Phase.<sup>80</sup> Durch den Adsorptionsprozess können z.B. Zielanalyten adsorbiert und Störkomponente eluiert werden, wodurch die Analyten angereichert werden können. Alternativ können auch



Störkomponente adsorbiert und Zielanalyten eluiert werden, wodurch ein Aufreinigen der Analyten erreicht werden kann.

Grundsätzlich können alle in der Flüssigchromatographie verwendeten stationären Phasen auch in der SPE eingesetzt werden, deshalb kann auch mit allen Trennmechanismen (Größenausschluss, Normalphasen, Umkehrphasen, Ionenaustausch usw.) gearbeitet werden.

Die Festphasenextraktion wird in der Regel in 4 Schritten durchgeführt, die in Abbildung 13 schematisch gezeigt wird.<sup>75, 83</sup>

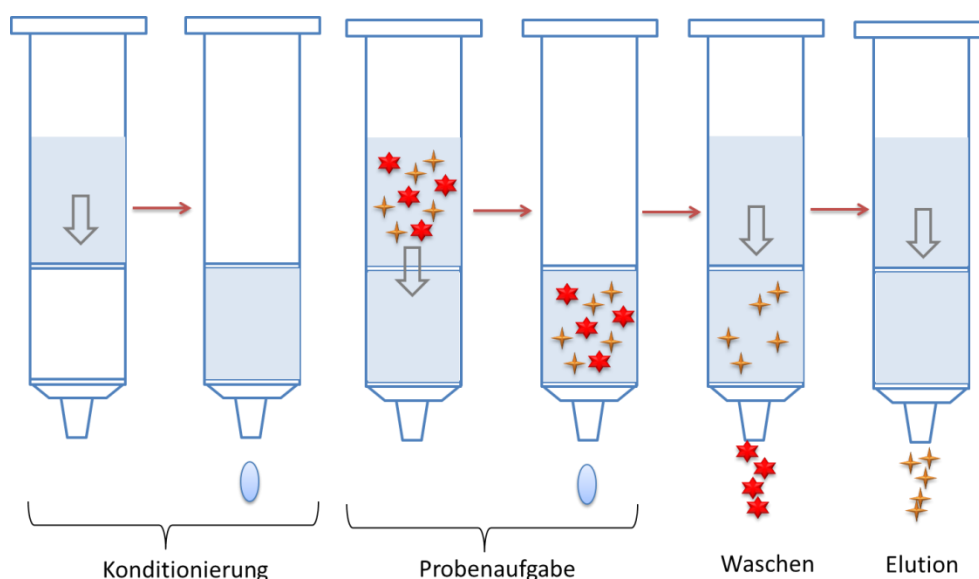


Abbildung 13: Schema der Festphasenextraktion.

Im ersten Schritt wird die Festphase (Sorbens) mit 2-3 Säulenvolumina eines Lösungsmittels vorkonditioniert, um die Luftblasen auszuschließen und eine reproduzierbare Wechselwirkung zu gewährleisten. Im zweiten Schritt wird die Probe mit den Zielanalyten und Störkomponenten durch das Sorbens gepumpt oder durch Vakuum gesaugt. Dabei wird die Probe am Sorbens adsorbiert. Anschließend wird das Sorbens mit einer Waschlösung gespült, wobei entweder die Störkomponenten oder Analyten von der Säule desorbiert werden. Schließlich werden die noch am Sorbens adsorbierten Substanzen durch ein geeignetes Elutionsmittel desorbiert und eluiert. Das Waschen und die Elution sollten nicht zu schnell erfolgen. In der Regel wird eine Geschwindigkeit von 1 mL/min als angemessen betrachtet.

Im Vergleich zur klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktion oder HPLC hat SPE die Vorteile wie einfache Handhabung, geringe Kosten, schnelle Trennung, sehr geringer

---

Lösungsmittelverbrauch und hohe Anreicherungsfaktoren. Jedoch ist die Selektivität bzw. Auflösung der Trennung viel niedriger als in der HPLC. In der Praxis wird SPE meistens zur Probenvorbereitung für HPLC-Messung verwendet, um Analyten anzureichern oder Störkomponenten zu entfernen. Außer der oben beschriebenen offline-Arbeitsweise kann SPE auch direkt online mit HPLC gekoppelt werden, wobei die SPE-Säule und die HPLC-Säule über Ventile miteinander verbunden sind.<sup>84, 85</sup>

---

## 5. Ergebnisse und Diskussion

---

In Hinsicht auf die Aufgabenstellung besteht der Ergebnis teil der vorliegenden Arbeit aus zwei Teilen, und zwar aus der Bestimmung der Molmassenverteilung von Polyhydroxybutyraten und der Endgruppencharakterisierung der Polylactide.

### 5.1. Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von PHB

In diesem Arbeitsteil soll die Molekulargewichtsverteilung von PHB bestimmt werden, und die Voraussetzung für universelle Kalibration im SDV/ $\text{CHCl}_3$ -System überprüft werden. Für die Untersuchungen standen die in Tabelle 1 aufgeführten Proben zur Verfügung.

Tabelle 1: Herkunft der PHB-Proben

Proben	Herkunft
PHB 1	Biomer (Krailling, Deutschland)
PHB2	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
PHB3	Goodfellow (Bad Nauheim, Deutschland)
Ex-1,4,6,12	PHB 1 extrudiert unter Verwendung unterschiedlicher Durchsätze und Drehzahlen

#### 5.1.1. SEC-Messungen in Chloroform gegen PS-Standards

Da Chloroform zu den wenigen Lösungsmitteln gehört, in welchen überhaupt PHB löslich ist, wurden zunächst SEC-Messungen in Chloroform durchgeführt. Wegen der Nichtverfügbarkeit kommerzieller eng verteilter PHB-Standards wurden die Messungen mit Polystyrol-Standards kalibriert. Die Kalibration auf Basis von Polystyrol kann keine absoluten Molekulargewichtsmittelwerte liefern, bietet jedoch die Möglichkeit für einen relativen Vergleich der Probenmolekulargewichte.

Zunächst musste eine geeignete Probenkonzentration identifiziert werden. Eine niedrige Probenkonzentration bedingt durch das extrem geringe Brechungsindexinkrement  $dn/dc$  ein niedriges Signal/Rausch-Verhältnis und damit schwankende Molekulargewichtsmittelwerte, während bei zu hohen Probenkonzentrationen Überladungseffekte der Säule auftreten können. Durch diese Überladungseffekte kommt es zu Veränderungen der Peaklage und Form, welche bei Kalibration gegen eine konventionelle Kalibrationskurve in physikalisch unsinnigen konzentrationsabhängigen Molekulargewichten resultieren. Um den Einfluss der Probenkonzentration auf das Elutionsvolumen zu ermitteln und eine geeignete Probenkonzentration festzulegen, wurde zunächst die Probe PHB1 bei Konzentrationen

zwischen 1 und 5 g/L vermessen. Die Probe PHB1 wurde gewählt, weil aus Voruntersuchungen bekannt war, dass diese das niedrigste SEC-Elutionsvolumen und damit die höchste Molmasse aufweist, und Überladungseffekte sich bei hochmolekularen Proben stärker bemerkbar machen als bei Proben geringerer Molmasse. Die unter Verwendung unterschiedlicher PHB-Konzentrationen erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 14 dargestellt.

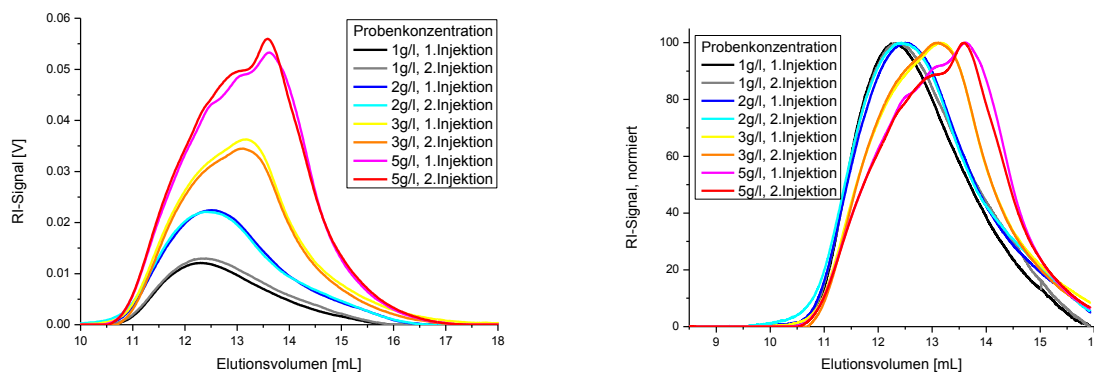


Abbildung 14: Überlagerung der Chromatogramme von PHB1 bei unterschiedlichen Konzentrationen. Eluent: Chloroform, RI-Detektion. (Injektionsvolumen: 100  $\mu$ L; Säulen: PSS SDV  $10^5$  Å und PSS SDV  $10^3$  Å bei Raumtemperatur; Flussrate: 0,6 mL/min) Links: RI-Signale ohne Normierung, rechts: RI-Signale auf gleiche Flächen normiert.

Aus den Diagrammen erkennt man, dass Chromatogramme zweier Injektionen der gleichen Konzentration gut reproduzierbar sind. Erwartungsgemäß steigt mit steigender Probenkonzentration die Peakfläche an, wobei sich jedoch sowohl die Peaklagen als auch die Peakformen verändern. Dies ist ein klarer Hinweis auf Überladungseffekte. Wie erwähnt, resultiert eine Verschiebung des Elutionsvolumens aufgrund der Konzentration in physikalisch unsinnigen konzentrationsabhängigen Molekulargewichten, wenn eine SEC-Auswertung gegen eine Kalibrationskurve vorgenommen wird. Der Vergleich der normierten Chromatogramme zeigt, dass die Peaklagen und -formen bei Probenkonzentrationen von 1 g/L und 2 g/L weitgehend übereinstimmen. Bei höheren Probenkonzentrationen hingegen steigt das Elutionsvolumen merklich an. Als Kompromiss zwischen einem stabilen Elutionsvolumen und einem zufriedenstellenden Signal-Rausch-Verhältnis des RI-Signals wurde daher für die weiteren Untersuchungen eine Probenkonzentration von 2 g/L festgelegt.

Nachdem eine geeignete Probenkonzentration identifiziert war, wurden alle weiteren PHB-Proben ebenfalls mittels SEC vermessen. Die erhaltenen Chromatogramme und die Polystyrol-Kalibrationskurve sind in Abbildung 15 dargestellt.

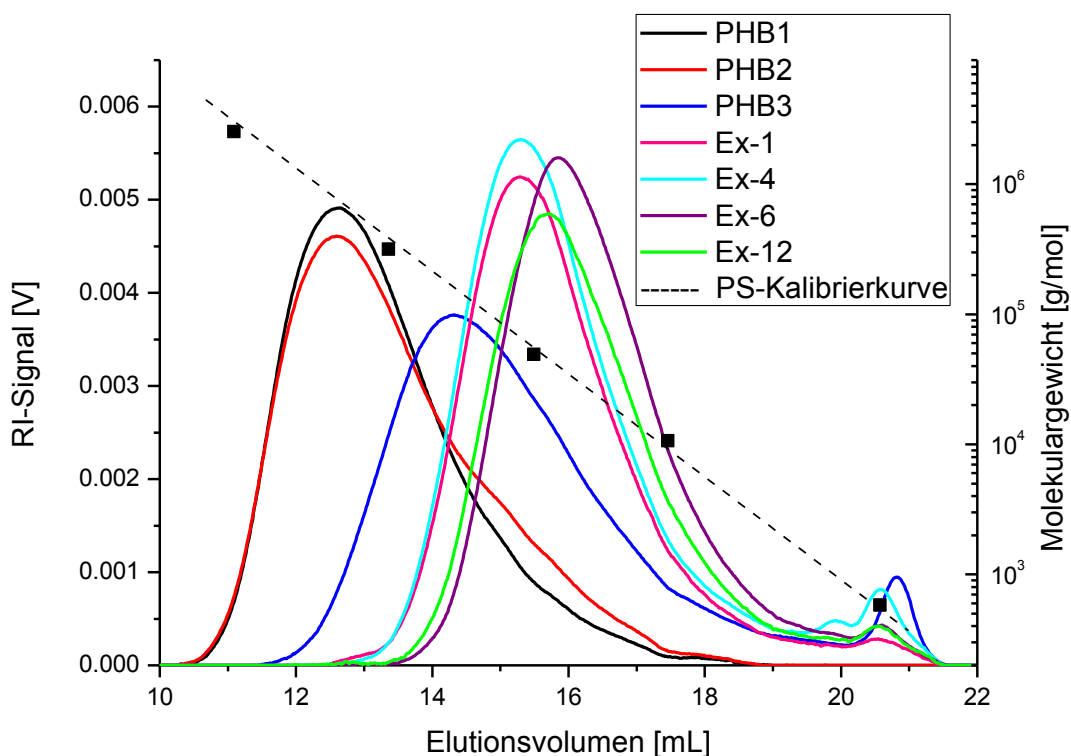


Abbildung 15: Überlagerung der Chromatogramme von PHB-Proben bei SEC-Messungen in Chloroform mit RI-Detektor. (Injektionsvolumen: 100  $\mu$ L; Probenkonzentration: 2 g/L; Säulen: PSS SDV  $10^5$  Å und PSS SDV  $10^3$  Å bei Raumtemperatur; Flussrate: 0.6 mL/min).

Man erkennt, dass sich die untersuchten Proben in der Lage der Chromatogramme deutlich voneinander unterscheiden. Die gegen die Polystyrol-Kalibrationskurve erhaltenen mittleren Molekulargewichte sind in Tabelle 4 zusammengefasst und werden im folgenden Kapitel mit den Werten aus Lichtstreuungen verglichen.

### 5.1.2. Kopplung von SEC und Lichtstreuung

Wie erwähnt, wurden durch SEC in Chloroform unter Verwendung der Polystyrol-Kalibrationskurve nur relative Molekulargewichte ermittelt. Zur Bestimmung der wahren Molekulargewichte kann SEC mit molmassensensitiven Detektoren, wie z.B. Lichtstreu- oder

Viskositätsdetektoren gekoppelt werden. Deshalb wurden SEC-Lichtstreuemessungen durchgeführt, um die wahren Molekulargewichte von PHB zu bestimmen.

### SEC-Lichtstreu-Messungen in Chloroform

Zunächst wurde die Eignung von Chloroform als Eluent für SEC-Lichtstreuemessungen untersucht, wobei die zuvor als geeignet identifizierte Probenkonzentration von 2 g/L verwendet wurde. Für diese Untersuchungen wurde zunächst nur eine einzige Säule eingesetzt, da lediglich geprüft werden sollte, ob im Lichtstreusignal hinreichend hohe Streuintensitäten erhalten werden können. Die erhaltenen RI- und 90°-Lichtstreuchromatogramme sind in Abbildung 16 gezeigt.

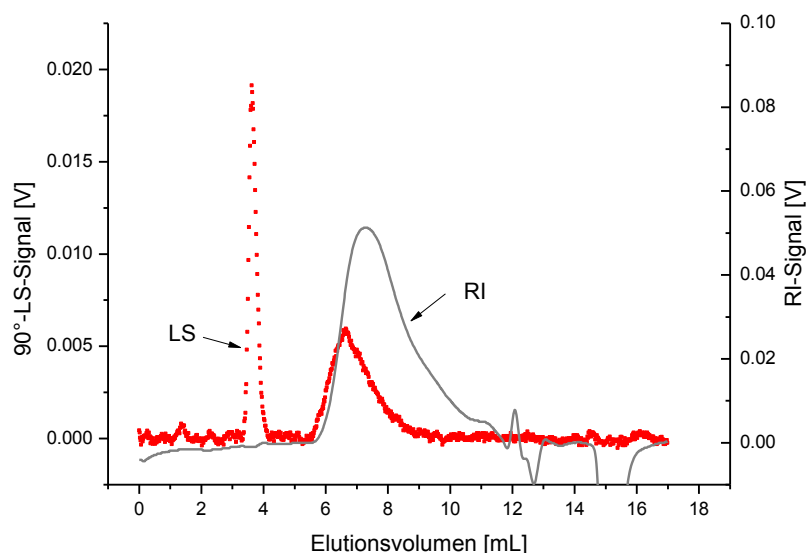


Abbildung 16: Chromatogramm von PHB 1 bei einer Probenkonzentration von 2g/L in  $\text{CHCl}_3$  mit RI- und LS-Detektor. (Injektionsvolumen: 100 $\mu\text{L}$ ; Säule: PSS SDV  $10^5 \text{ \AA}$  bei Raumtemperatur; Flussrate: 0.6 mL/min)

Wie man erkennt, ist das Signal-Rauschen-Verhältnis für das Lichtstreusignal sehr gering, was durch das sehr niedrige Brechungsindexinkrement des PHB in Chloroform erklärt werden kann. Die Signalintensitäten sowohl des Brechungsindexdetektors (RI) als auch des Lichtstredetektors (LS) sind vom Brechungsindexinkrement  $\text{dn}/\text{dc}$  abhängig, wobei die Intensität des RI-Signales direkt proportional zum Brechungsindexinkrement ist, während das LS-Signal vom Quadrat des  $\text{dn}/\text{dc}$ -Wertes abhängt. Somit macht sich ein geringes Brechungsindexinkrement stärker im Lichtstreu- als im RI-Signal bemerkbar.

In der Literatur wird für  $dn/dc$  von PHB in Chloroform ein Wert von  $dn/dc = 0.033 \text{ mL/g}$  genannt<sup>86</sup>. Dieser Wert beträgt nur ca. 1/5 des  $dn/dc$ -Wertes von Polystyrol in Chloroform<sup>87</sup>, d.h. dass bei gleichen Konzentrationen die RI-Signalintensität von PHB nur ca. 1/5 der Intensität eines Polysytrols gleichen Molekulargewichtes beträgt. Die Intensität des LS-Signals hingegen erreicht nur 1/25 denjenigen von Polystyrol.

In Abbildung 16 erkennt man weiterhin zwei Peaks im LS-Signal, einen scharfen Peak bei 3.7 mL und einen breiten Peak um 6.5 mL, welcher bei Messungen des reinen Lösemittels nicht gefunden wird. Hingegen zeigt sich im RI-Detektor nur ein einziger monomodaler Peak. In der 3D-Auftragung der LS-Signale bei unterschiedlichen Streuwinkeln (siehe Abbildung 17) beobachtet man eine starke Zunahme der Intensität des ersten Peaks mit sinkendem Streuwinkel infolge der intramolekularen Interferenz des Streulichtes. Dies weist auf sehr große Moleküle mit hohen Molekulargewichten hin. Vermutlich entsteht der Peak beim kleineren Elutionsvolumen durch Aggregatbildung oder ungelöste Anteile des Polymeren, während der Peak um 6.5 mL den Einzelketten des PHB zuzuordnen ist.

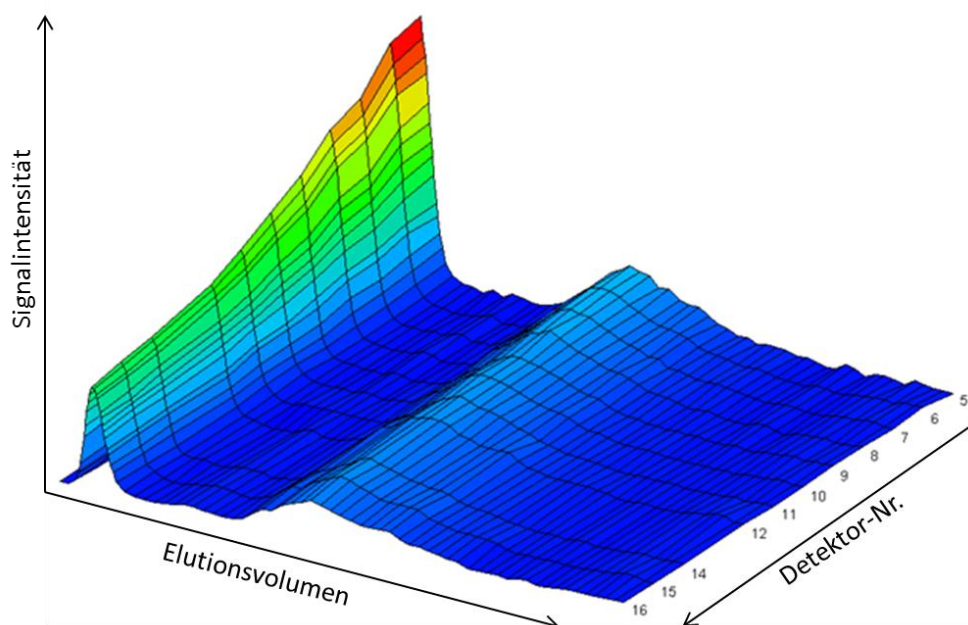


Abbildung 17: 3D-Darstellung der Lichtstreuintensitäten für unterschiedliche Streuwinkel.

Da, wie vorher erwähnt, die Probe PHB1 die höchste Molmasse aufweisen sollte und schon für diese aufgrund des geringen Brechungsindexinkrementes von PHB in  $\text{CHCl}_3$  nur sehr geringe Signalintensitäten im Lichtstreuensignal erhalten werden, erwartet man für die anderen Proben noch geringere Signal-Rauschen-Verhältnisse, wodurch Chloroform als Eluent zur Bestimmung der absoluten Molmassen von PHB mittels SEC-LS nicht geeignet ist.

Deshalb wurde nach einem alternativen Lösungsmittel gesucht, in welchem PHB ein höheres Brechungsindexinkrement aufweist.

### SEC-Lichtstreu-Messungen in Trifluoroethanol

Ein weiteres in der Literatur genanntes Lösungsmittel für PHB ist Trifluorethanol, in welchem PHB ein Brechungsindexinkrement von  $dn/dc = 0.152 \text{ mL/g}$  besitzt.<sup>35, 88</sup> Um eine Aggregatbildung zu vermeiden, wurden zu dem Trifluorethanol 50 mmol/L Kaliumtrifluoracetat (KTFAc) zugesetzt.

Die RI- und 90°-Lichtstreichromatogramme sind in Abbildung 18 exemplarisch für die hochmolekulare Probe PHB 1 und die niedermolekulare Probe Ex-4 dargestellt.

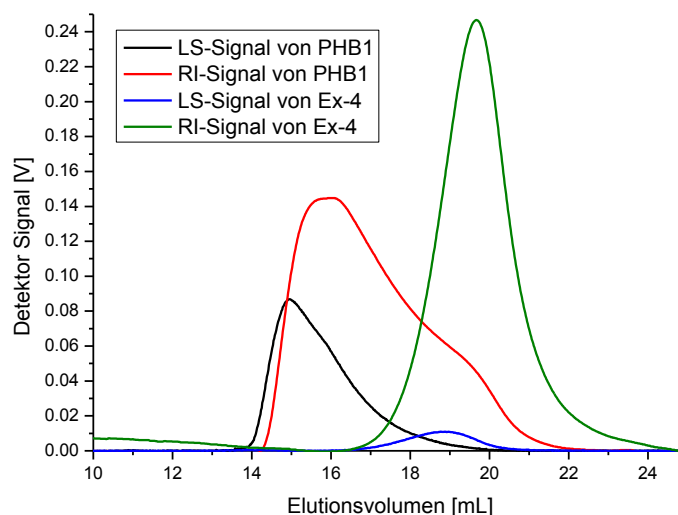


Abbildung 18: Chromatogramme von PHB 1 und Ex-4 bei einer Probenkonzentration von 2 g/L in TFE (mit 50 mmol KTFAc) mit RI- und LS-Detektor. (Injektionsvolumen: 100  $\mu\text{L}$ ; Säulen: PSS PFG Vorsäule + PSS PFG 1000 Å und PSS PFG 100 Å bei Raumtemperatur; Flussrate: 1 mL/min)

Wie man erkennt, zeigt die Probe PHB 1 im 90°-Lichtstreichromatogramm ein erheblich besseres Signal/Rauschen-Verhältnis als in Chloroform bei gleicher Probenkonzentration (s. Abbildung 16). Auch die niedermolekulare Probe Ex-4 zeigt noch ein akzeptables Signal/Rauschen-Verhältnis von ca. 31. Hinsichtlich der Signalintensität ist TFE somit erheblich besser geeignet als Chloroform.

Eine zusätzliche Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses kann durch Verwendung höherer Probenkonzentrationen erreicht werden. Hierdurch kann es jedoch zu einer



Veränderung der Peaklagen kommen, was bei Bestimmung der Molekulargewichte gegen eine Kalibrationskurve zu physikalisch unsinnigen konzentrationsabhängigen Molekulargewichten führt. Bei der Bestimmung der gewichtsmittleren Molekulargewichte durch SEC-Lichtstreuungsdetektion geht die Peaklage hingegen nicht in die Bestimmung der Molekulargewichte ein. Jedoch liegt hier die Annahme zugrunde, dass die Probenkonzentration am Detektor hinreichend gering ist, um intermolekulare Wechselwirkungen, die sich durch einen nicht vernachlässigbaren Term  $2A_2 \cdot c$  in Gleichung 15 äußern, auszuschließen. Um dies zu prüfen, wurden für die Probe PHB1 die Molekulargewichte für unterschiedliche Probenkonzentrationen bestimmt. Die Ergebnisse (jeweils 2 Injektionen) sind in Tabelle 2 wiedergegeben und in Abbildung 19 gegen die Konzentration aufgetragen.

Tabelle 2: Mittlere Molekulargewichte von PHB 1 aus LS-Messungen in TFE bei unterschiedlichen Probenkonzentrationen. Für jede Probenkonzentration wurden 2 Injektionen durchgeführt. (Die angegebenen statistischen Fehler beruhen auf Abschätzungen aufgrund der Signal/Rausch-Verhältnisse des LS- und RI-Signals und werden von der verwendeten LS-Software berechnet.)

Probenkonzentration [g/L]	$M_w$ [g/mol]	Fehlerabweichung
0.5	4.385E+05	10.0%
0.5	4.774E+05	5.0%
1	5.092E+05	3.0%
1	5.283E+05	2.3%
2	5.000E+05	2.4%
2	5.161E+05	2.5%
5	4.227E+05	1.8%
5	4.048E+05	2.0%
10	3.660E+05	1.4%
10	3.808E+05	1.5%

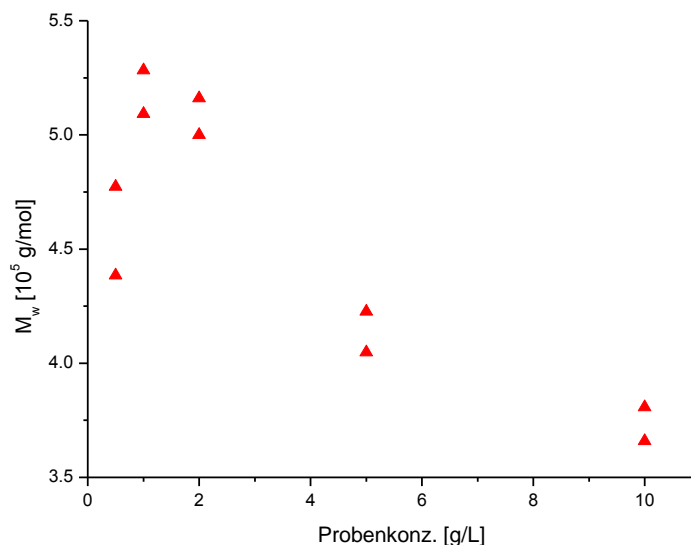


Abbildung 19: Mittlere Molekulargewichte aus LS-Messungen in TFE aufgetragen gegen Probenkonzentrationen.

Aus Tabelle 2 bzw. Abbildung 19 wird klar, dass mit steigender Konzentration der statistische Fehler aufgrund des besseren Signal/Rausch-Verhältnisses abnimmt. Gleichzeitig wird eine Abnahme der ermittelten Molekulargewichte mit steigender Probenkonzentration beobachtet, welche auf die Konzentrationsabhängigkeit des Lichtstreuungseffektes hinweist. Um einerseits die Konzentrationsabhängigkeit vernachlässigen zu können, andererseits aber hinreichend hohe Signalintensitäten und damit einen möglichst geringen statistischen Fehler zu erzielen, wurde eine Probekonzentration von 2 g/L für die weiteren Untersuchungen festgelegt.

Alle zur Verfügung stehenden PHB-Proben wurden daher bei dieser Probenkonzentration in TFE vermessen. Mittels SEC-Lichtstreuungskopplung erhält man bei jeder Probe zu jedem Elutionsvolumen ein absolutes Molekulargewicht (Kalibrationskurve). Die erhaltenen Chromatogramme sowie die mittels SEC-LS bestimmten Kalibrationskurven sind in Abbildung 20 überlagert:

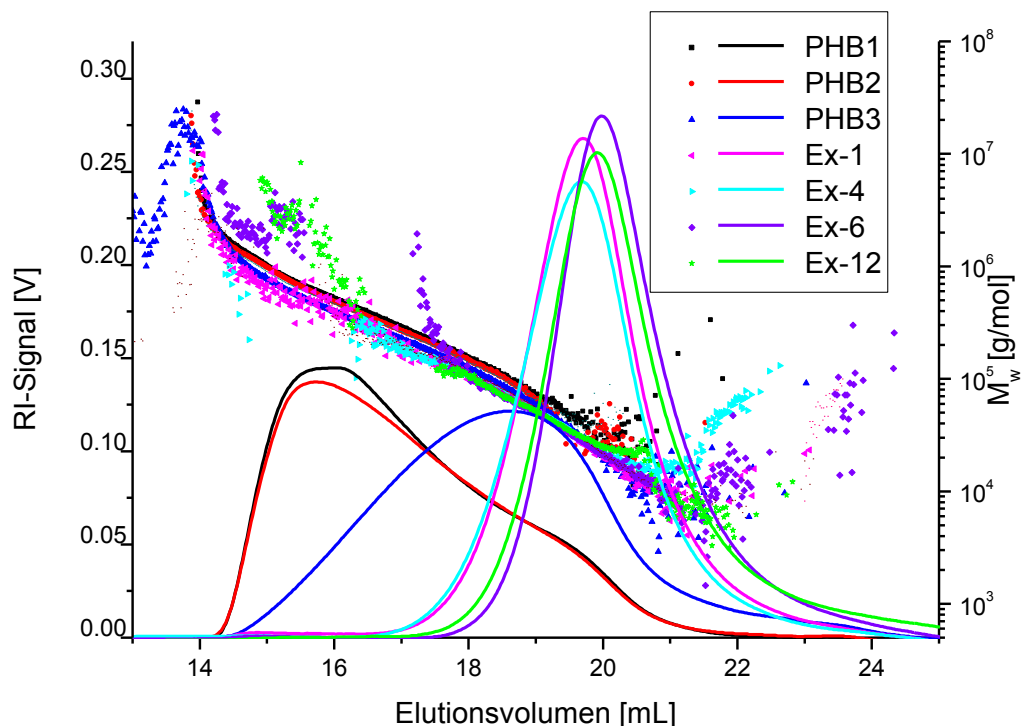


Abbildung 20: RI-Signale und Kalibrationskurven der Messungen der PHB-Proben in TFE (mit 50 mM KTFAC). (Injektionsvolumen: 100  $\mu$ L; Säulen: PSS PFG Vorsäule + PSS PFG 1000 Å und PSS PFG 100 Å bei Raumtemperatur; Flussrate: 1 mL/min; Detektor: RI und LS)

Für jede Probe erhält man eine Kalibrationskurve, die etwa eine Dekade im Molekulargewicht überstreicht. Wie man erkennen kann, stimmen die Kalibrationskurven aller Proben gut überein. Insbesondere gehen die Kalibrationskurven der bei kleinen Volumen eluierenden Proben nahezu perfekt in die Kalibrationskurven der Proben mit hohem Elutionsvolumen über. So erhält man eine Kalibration über einen Molekulargewichtsbereich von  $10^4$  g/mol bis  $10^6$  g/mol. Oberhalb des Bereichs findet keine Trennung nach Molekulargewicht mehr statt, da wahrscheinlich die Ausschlussgrenze des Säulensystems erreicht wird. Unterhalb des genannten Bereiches ist die LS-Signalintensität wegen der niedrigen Konzentrationen und geringen Molekulargewichte schwach, was ein schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis zur Folge hat und somit die stärkere Streuung der Kalibrationspunkte erklärt.

Um zu prüfen, ob die Zugabe des Salzes im Eluenten zum Abbau des Polymeren oder zur Verringerung von Aggregaten führt, wurden einige PHB-Proben unter identischen Bedingungen aber ohne Salzzusatz untersucht. Die erhaltenen Molekulargewichte sind in Tabelle 3 denen unter Salzzusatz gegenübergestellt. Im Rahmen der Messgenauigkeit der

Methode sind die Ergebnisse als identisch zu betrachten. Somit hat der Zusatz von LiCl weder positive noch negative Effekte.

Tabelle 3: Vergleich der Molekulargewichte aus Lichtstreuung in TFE mit und ohne KTFac.

Elutionsmittel	Gewichtsmittleres Molekulargewicht [ $10^3$ g/mol]			
	PHB 1	PHB 3	Ex-4	Ex-6
TFE + 50mM KTFac	505	182	502	317
TFE	491	163	507	326

Die aus den SEC-LS-Messungen erhaltenen gewichtsmittleren Molekulargewichte werden in der Tabelle 4 mit Werten verglichen, die gegen konventionelle SEC-Kalibration mit Polystyrol erhalten werden.

Tabelle 4: Vergleich der gewichtsmittleren Molekulargewichte aus SEC mittels Polystyrol-Kalibration und SEC-LS-Messungen.

Proben	$M_w$ aus LS [g/mol]	$M_w$ aus PS-Kalibration [g/mol]	Abweichung [%]
PHB 1	5,0950E+05	6.0066E+05	17.9
PHB 2	4,8373E+05	5.6787E+05	17.4
PHB 3	1,8910E+05	1.3476E+05	-28.7
Ex-1	5,1590E+04	6.0744E+04	17.7
Ex-4	5,0970E+04	5.8041E+04	13.9
Ex-6	3,2493E+04	3.6788E+04	13.2
Ex-12	3,5467E+04	4.2968E+04	21.1

Man erkennt, dass (mit Ausnahme der Probe PHB 3) die relativen Molekulargewichte aus Polystyrol-Kalibration systematisch ca. 17 % höher liegen als die wahren Molekulargewichte, die durch Lichtstreuungsmessungen erhalten wurden. Dies weist darauf hin, dass sich die Kalibrierkurven von Polystyrol und PHB unterscheiden und bei gleichem Molekulargewicht das hydrodynamische Volumen von Polystyrol in Chloroform geringer ist als das von PHB. Der Grund für die Abweichung der Probe PHB 3 ist unbekannt. Da diese Probe jedoch auch bei anderen Messungen ein von den restlichen Proben abweichendes Verhalten zeigt (s.U.), ist anzunehmen, dass es sich hier um einen probenspezifischen Effekt und nicht um ein methodisches Problem handelt.

### 5.1.3. Kopplung von SEC und Viskosimetrie

Die SEC-Viskositätskopplung bietet eine weitere Möglichkeit um die wahren Molekulargewichte von Polymeren ohne Kalibration mit eng verteilten Standards der gleichen chemischen Struktur wie der des Kalibranten zu bestimmen. Daher wurde diese Methode ebenfalls für ihre Eignung zur Bestimmung der Molekulargewichte von PHB geprüft.

Die Molmassenbestimmung mittels Viskosimeter beruht auf der universellen Kalibration, die durch Gleichung 9 beschrieben wird. Das Produkt von intrinsischer Viskosität und Molekulargewicht ist, unabhängig von Polymerart und –struktur, proportional zum hydrodynamischen Volumen (Gleichung 6). Wenn man somit dieses Produkt für unterschiedliche Polymere gegen das Elutionsvolumen aufträgt, fallen alle Polymere für welche ein reiner Größenausschlussmechanismus vorliegt auf eine gemeinsame Kurve, die universelle Kalibrierkurve. Erstellt man mit Polymerstandards eine solche universelle Kalibrationskurve, so kann man anhand dieser die wahren Molekulargewichte von Proben anderer chemischer Struktur ermitteln, wenn man die zugehörigen intrinsischen Viskositäten experimentell z.B. mittels eines Durchflussviskositätsdetektors bestimmt.

Um dies für PHB zu überprüfen wurde in Chloroform eine universelle Kalibrationskurve erstellt, indem die intrinsischen Viskositäten der Polystyrol-Standards bekannter Molmassen unter Verwendung eines SEC-Viskositätsdetektors bestimmt und die Produkte  $[\eta] \cdot M$  gegen das Elutionsvolumen aufgetragen wurden (s. Abbildung 21).

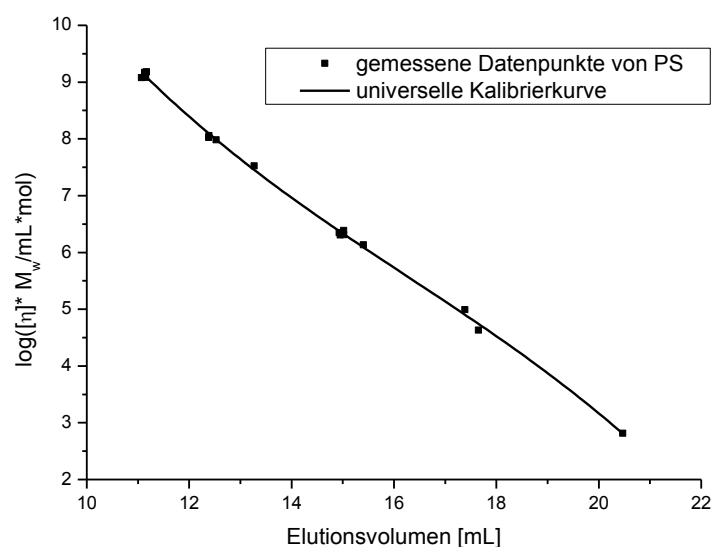


Abbildung 21: Universelle Kalibration durch Polystyrol-Standards. ( $K = 15.4 \times 10^{-3} \text{ mL/g}$ ;  $a = 0.72$ )<sup>29</sup>.

Anschließend wurden die PHB-Proben ebenfalls mittels SEC-Viskositätsdetektion untersucht. Mittels der universellen Kalibrationskurve und den zugehörigen gemessenen intrinsischen Viskositäten wurden die Molekulargewichte der PHB-Proben ermittelt, die in der Tabelle 5 wiedergegeben und mit den Werten der Lichtstreuemessungen in TFE verglichen werden.

Tabelle 5: Vergleich der gewichtsmittleren Molekulargewichte aus SEC-LS-Messungen und SEC-Viskosimetrie-Messungen.

Proben	M <sub>w</sub> aus LS [g/mol]	M <sub>w</sub> aus Viskosimetrie [g/mol]	Abweichung [%]
PHB 1	5,0950E+05	5.1435E+05	1.0
PHB2	4,8373E+05	5.3850E+05	11.3
PHB3	1,8910E+05	1.7433E+05	-7.8
Ex-1	5,1590E+04	4.7053E+04	-8.8
Ex-4	5,0970E+04	4.6859E+04	-8.1
Ex-6	3,2493E+04	3.0748E+04	-5.4

Bei allen Proben sind die Abweichungen zwischen den Molekulargewichten aus beiden Methoden mit maximal 11% in den Fehlergrenzen, die man auch für die Genauigkeit der Lichtstreuemessungen annehmen kann. Während jedoch Molekulargewichte aus der SEC mit Polystyrolkalibration systematisch von den durch Lichtstreuemessungen ermittelten Molekulargewichten abweichen, handelt es sich bei den durch SEC-Viskositätskopplung erhaltenen Abweichungen um statistische Fehler, bei denen durch universelle Kalibration teilweise höhere und teilweise niedrigere Molmassen erhalten werden. Somit kann festgestellt werden, dass PHB und Polystyrol unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen der universellen Kalibration gehorchen und damit eine wechselwirkungsfreie Elution gegeben ist.

Da man durch die SEC-Viskosität-Kopplung sowohl die intrinsische Viskosität als auch das Molekulargewicht der PHB-Proben bestimmt, kann man mit Hilfe der Mark-Houwink-Auftragung die Mark-Houwink-Parameter ermitteln und damit eine Aussage über den Lösungszustand von PHB in Chloroform treffen.

Die entsprechende Auftragung ist in Abbildung 22 dargestellt. Sie liefert die folgenden Mark-Houwink-Parameter:

$$K = 20.4 \cdot 10^{-3} \text{ mL/g}, \quad a = 0.70$$

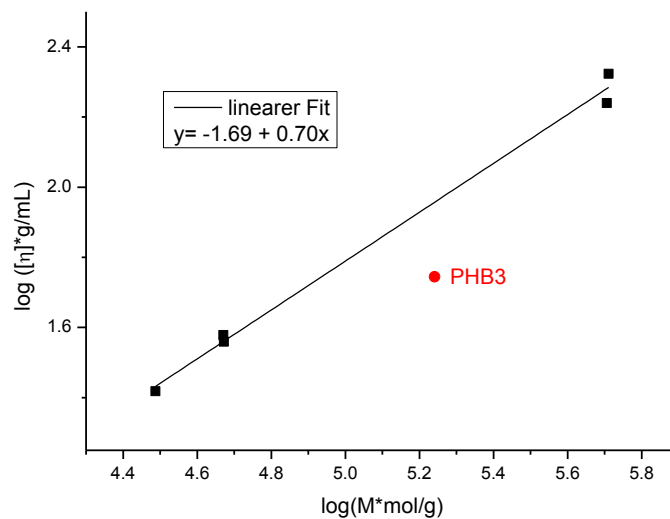


Abbildung 22: Mark-Houwink-Auftragung für PHB in Chloroform.

Der Wert des Mark-Houwink-Exponenten,  $a = 0.7$ , ist in guter Übereinstimmung zu den Werten die in der Literatur für PHB in Chloroform genannt werden (siehe Tabelle 6). Er deutet darauf hin, dass die Polymermoleküle in Chloroform als ausgeweitete flexible Knäuel vorliegen. Der Unterschied der Mark-Houwink-Parameter  $K$  zu den Literaturwerten kann dadurch erklärt werden, dass in der vorliegenden Arbeit nur etwa 2 Dekaden im Molekulargewicht abgedeckt werden ( $\log M$  4.5 - 5.8) und zur Bestimmung von  $K$  eine Extrapolation über mehr als 4 Dekaden notwendig ist. Geringe Fehler in der Steigung (Mark-Houwink-Exponent) machen sich somit in erheblichen Fehlern des Mark-Houwink-Parameters  $K$  bemerkbar. Im Allgemeinen kompensieren sich derartige Fehler, da ein größerer Mark-Houwink-Exponent,  $a$ , meist zu kleinen Mark-Houwink-Parameter,  $K$ , führt. Dies ist auch in der vorliegenden Arbeit zu erkennen.

Tabelle 6: Literaturwerte für Mark-Houwink-Parameter von Polystyrol und PHB in  $\text{CHCl}_3$ .

Polymer	$K [10^{-3} \text{mL g}^{-1}]$	$a$	Literatur
PHB	7.7	0.82	<sup>36</sup>
	11.8	0.78	<sup>35</sup>
	16.6	0.76	<sup>35</sup>

---

#### 5.1.4. Kalibration mit breiten Proben

Wie schon erwähnt, sind eng verteilte PHB-Standards nicht kommerziell verfügbar, wodurch eine konventionelle Kalibration nicht möglich ist. Die Kalibration mit Polystyrol-Standards hingegen liefert systematische Abweichungen von etwa 20 % zwischen den wahren, durch Lichtstreuung bestimmten Werten. Eine Kopplung mit einer Lichtstreu- oder Viskositätsdetektion kann zwar die wahre Molekulargewichtsverteilung liefern, ist aber für den Routineeinsatz oftmals zu teuer und zu aufwändig. Zudem kann die Lichtstreuung aufgrund des niedrigen Brechungsindexinkrementes nicht in Chloroform betrieben werden. Der Einsatz von TFE hingegen ist aufgrund des höheren Preises und der höheren Toxizität nicht vorteilhaft. Daher wurde geprüft, ob man basierend auf kommerziell verfügbaren Polymerstandards dennoch die wahren Molekulargewichte von PHB mittels SEC bestimmen kann. Eine Möglichkeit hierzu bietet die Kalibration mit breiten Proben. Dabei sind zwei Methoden zu unterscheiden, die breite Kalibration und die integrale Kalibration.

##### Breite Kalibration

Wie in Kap. 4.5.1 erwähnt, bietet die Methode der breiten Kalibration einen weiteren Weg, um auch ohne kommerzielle engverteilte Proben der Struktur des Analyten verlässliche Kalibrationskurven zu erstellen.

Zur Bestimmung der Kalibrationskurve von PHB in Chloroform wurde in dieser Arbeit Polystyrol als Basiskalibrant verwendet. Für die Bestimmung der Parameter A und B wurden die in Chloroform erhaltenen Chromatogramme und die durch Lichtstreuung in TFE ermittelten gewichtsmittleren Molmassen der Proben PHB1, Ex-4 und Ex-6 verwendet. Aus der Anpassungsrechnung, die in Kap.4.5.1 beschrieben wird, ergaben sich folgende Werte für die Parameter A und B:

$$A = 1.44, \quad B = 0.96$$

Der Wert für den Parameter B von nahezu 1 deutet an, dass die Kalibrationskurven von Polystyrol und PHB nahezu linear gegeneinander verschoben sind. Dies wiederum belegt, dass die Mark-Houwink-Exponenten und damit die Struktur von Polystyrol und PHB in Lösung ähnlich sind. Da Polystyrol in Chloroform als Knäuel vorliegt, gilt dies somit auch für PHB.



---

Mit Hilfe der Mark-Houwink-Koeffizienten vom Polystyrol in Chloroform ( $K = 15.4 \cdot 10^{-3} \text{ mL/g}$ ,  $\alpha = 0.72$ )<sup>29</sup> lassen sich anhand der Gleichung 11 auch die Mark-Houwink-Parameter von PHB in Chloroform bestimmen. Es ergibt sich:

$$K = 8.58 \cdot 10^{-3} \text{ mL/g}, a = 0.80$$

Die Werte korrelieren gut mit den Werten aus SEC-Viskosität-Messungen und den Literaturwerten (siehe Kap. 5.1.3), insbesondere belegt der Mark-Houwink-Exponent das Vorliegen eines Knäuels in einem guten Lösungsmittel.

Mittels der Kalibrationskurve aus der breiten Kalibration kann man nun die Molekulargewichte für alle PHB-Proben bestimmen. Diese werden in Tabelle 7 den Werten aus Lichtstreuungsmessungen gegenübergestellt. Wie man erkennen kann, führt die Methode der breiten Kalibration für alle Proben zu sehr guten Übereinstimmungen mit Ausnahme der Probe PHB3, für welche auch früher schon Abweichungen erhalten wurden. Dabei ist zu beachten, dass für die Bestimmung der Fitparameter A und B lediglich die Proben PHB 1, Ex-4 und Ex-6 verwendet wurden, welche somit zwangsweise gute Übereinstimmungen liefern sollten. Dies gilt jedoch nicht für die anderen Proben. Die verlässliche Bestimmung der Molekulargewichte auch für die Proben, welche nicht in die Bestimmung der Parameter A und B einbezogen wurden, belegt somit, dass die erhaltenen Parameter universellen Charakter für PHB besitzen und somit die Molekulargewichte unbekannter PHB-Proben basierend auf einer Polystyrol-Kalibrationskurve bestimmt werden können.

### **Integrale Kalibration**

Wie erwähnt, gibt es außer der breiten Kalibration noch ein weiteres Verfahren, um unter Verwendung von Proben breiter Molekulargewichtsverteilung eine Kalibrationskurve zu erstellen. Die Methode der integralen Kalibration verwendet dabei nicht die Molekulargewichtsmittelwerte mehrerer breitverteilter Proben, sondern es muss die integrale (kumulative) Molekulargewichtsverteilung einer oder mehrerer breitverteilter Proben der gleichen chemischen Struktur wie der des Analyten bekannt sein. Die Vorgehensweise zur Durchführung der integralen Kalibration wurde in Kap. 4.5.1 beschrieben.

Für die Bestimmung der integralen Verteilungen wurden die Proben PHB1, Ex-4 und Ex-6 gewählt, da hierdurch ein möglichst großer Molekulargewichts- bzw. Elutionsvolumenbereich erfasst wurde. Die jeweils durch integrale Kalibration erhaltenen

Kalibrationskurven der 3 Proben wurden anschließend kombiniert und gemeinsam mit einem Polynom fünftes Grades angepasst (siehe Abbildung 23). Mit Hilfe dieser Kalibrationskurve wurden dann die Molekulargewichte aller PHB-Proben in Chloroform ermittelt. Diese sind in Tabelle 7 zusammengefasst und mit den Molekulargewichten aus LS verglichen. Zunächst erkennt man aus Abbildung 23, dass tatsächlich die für die 3 genannten Proben ermittelten Kalibrationskurven ineinander übergehen. Lediglich im Bereich der sehr kleinen Molmassen kommt es zu Abweichungen, welche auf das in diesem Bereich sehr geringe Lichtstreuungssignal und den damit verbundenen größeren Fehler in den Molekulargewichten und damit in den integralen Molekulargewichtsverteilungen zurückzuführen ist.

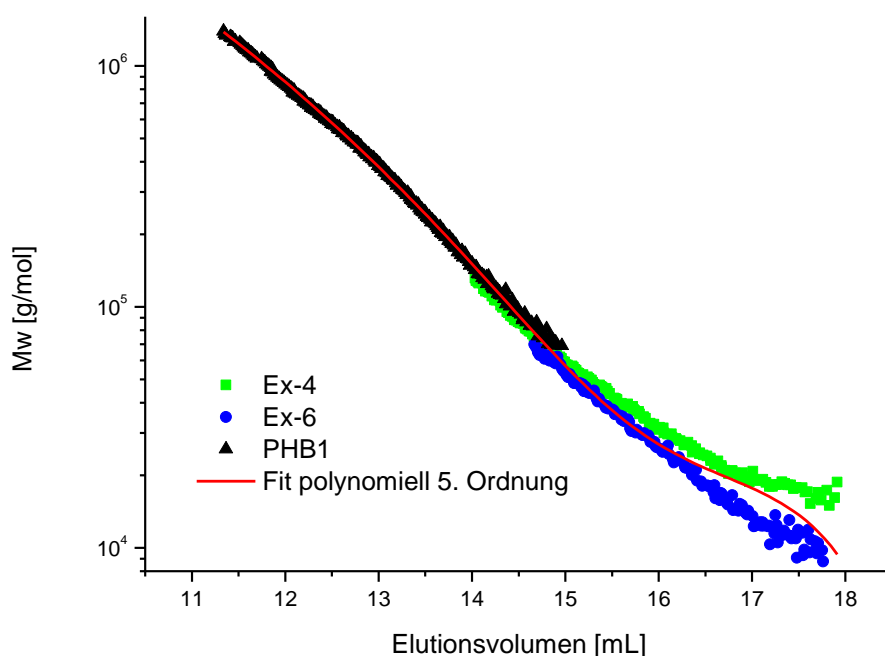


Abbildung 23: Integrals Kalibrierkurven für die Proben PHB1, Ex-4, Ex-6 in Chloroform und die Anpassung durch ein Polynom fünfter Ordnung.

### Vergleich der Molekulargewichte aus breiter, integraler Kalibration und Lichtstreuungsmessungen

Um Qualität der unterschiedlichen Kalibrationen mit breiten Proben zu bewerten, wurden die prozentualen Fehler nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Abweichung [\%]} = (M_{w,\text{int./br.Kalibr.}} - M_{w,LS}) / M_{w,LS} * 100 \quad \text{Gleichung 20}$$

Die so ermittelten Abweichungen vom wahren Molekulargewicht sind in Tabelle 7 wiedergegeben und in Abbildung 24 als Funktion des Molekulargewichtes grafisch dargestellt.

Tabelle 7: Vergleich der gewichtsmittleren Molekulargewichte aus Lichtstreuungsmessungen, breiter und integraler Kalibration. Die grün unterlegten Proben wurden jeweils für die entsprechenden Kalibrationen herangezogen.

Proben	M <sub>w</sub> aus LS [g/mol]	intgrale Kalibration		breite Kalibration	
		M <sub>w</sub> [g/mol]	Abweichung [%]	M <sub>w</sub> [g/mol]	Abweichung [%]
PHB 1	5,0950E+05	4,9591E+05	-2,7	5,1163E+05	0,4
PHB2	4,8373E+05	4,4090E+05	-8,9	4,5092E+05	-6,8
PHB3	1,8910E+05	1,1419E+05	-39,6	1,1324E+05	-40,1
Ex-1	5,1590E+04	5,0312E+04	-2,5	5,3174E+04	3,1
Ex-4	5,0970E+04	4,8355E+04	-5,1	5,0936E+04	-0,1
Ex-6	3,2493E+04	3,1617E+04	-2,7	3,2967E+04	1,5
Ex-12	3,5467E+04	3,6333E+04	2,4	3,8231E+04	7,8

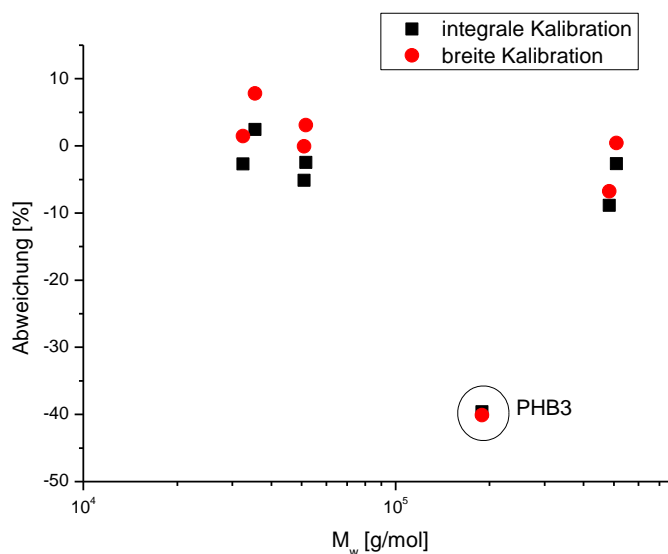


Abbildung 24: Prozentuale Abweichungen der Molekulargewichte aus integraler und breiter Kalibration im Vergleich zu denen aus der Lichtstreuung.

Mit Ausnahme der Probe PHB3 beobachtet man eine sehr gute Übereinstimmung der Werte aus integraler bzw. breiter Kalibration in Chloroform mit den Werten aus Lichtstreuung in TFE. Die Fehler liegen unter 10 % und damit in einem Bereich, der dem Fehler bei der Bestimmung der Molekulargewichte mittels Lichtstreuung entspricht. Für die Probe PHB3 sind jedoch die Molekulargewichte aus den Kalibrationen mit breiten Proben ca. 40 %

---

kleiner. Da diese Proben jedoch in allen untersuchten Methoden zu erheblichen Abweichungen führt, ist diese Abweichung mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf methodische Fehler sondern vielmehr auf eine Probenbesonderheit zurückzuführen. Hierfür sind mehrere Gründe möglich. Ein möglicher Grund liegt im möglichen Vorhandensein von Additiven oder Copolymeren, die unterschiedliche Löslichkeit in  $\text{CHCl}_3$  und TFE haben und irreführende Signale beim RI-Detektor verursachen.

Dennoch lässt sich feststellen, dass die integrale Kalibration eine geeignete Methode ist, um eine Kalibrationskurve für PHB zu erstellen. Jedoch benötigt diese Methode kommerzielle Standards, deren Massenverteilung genau bekannt sein muss. Derartige Standards sind aber aktuell nicht verfügbar. Daher ist die Methode der breiten Kalibration, welche auf kommerziell verfügbaren Polystyrol-Standards basiert, zu bevorzugen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Verwendung einer Polystyrolkalibration die wahren Molekulargewichte von PHB um ca. 20% überschätzt. Durch Einsatz der Lichtstreu- und Viskositätskopplung konnte gezeigt werden, dass PHB unter Verwendung von SDV-Phasen und Chloroform als Eluent wechselwirkungsfrei eluiert. Somit lässt sich eine Polystyrolkalibration in eine PHB-Kalibration umrechnen. Die hierfür benötigten Korrekturfaktoren wurden ebenfalls ermittelt.

## 5.2. Endgruppencharakterisierung von Polylactid

In diesem Arbeitsteil sollen Methoden zur Charakterisierung der Endgruppen in Polylactiden entwickelt werden.

Zum Lösen dieser Aufgabe standen die in Tabelle 8 aufgeführten technischen und Laborproben zur Verfügung, die sich in ihren Molekulargewichten, Endgruppen und stereochemischen Zusammensetzungen unterscheiden.

Tabelle 8: Mittlere Molekulargewichte, Endgruppen und stereochemische Zusammensetzungen der zur Verfügung stehenden PLA-Proben.

Proben	$M_n^*$ [kg/mol]	$M_w^*$ [kg/mol]	Endgruppen <sup>†</sup>	L/D-Verhältnisse	Herkunft
PLA1	74	160	unbekannt	unbekannt	Technische Proben
PLA2	3	4	OH, Butylester	100/0 (PLLA)	Laborproben
PLA3	5	9	OH, Butylester	100/0 (PLLA)	Laborproben
PLA4	13	17	OH, Butylester	100/0 (PLLA)	Laborproben
PLA5	15	32	OH, Butylester	100/0 (PLLA)	Laborproben
PLA6	44	59	OH, Dodecylester	100/0 (PLLA)	Medizinische Proben
PLA7	29	76	OH, Butylester	100/0 (PLLA)	Laborproben
PLA8	101	170	OH, Dodecylester	0/100 (PDLA)	Medizinische Proben
PLA9	111	249	OH, Dodecylester	100/0 (PLLA)	Medizinische Proben
PLA10	154	440	OH, Dodecylester	100/0 (PLLA)	Medizinische Proben
PLA11	135	288	OH, COOH	100/0 (PLLA)	Medizinische Proben
PLA12	105	227	OH, Dodecylester	85/15	Medizinische Proben
PLA13	158	366	OH, Dodecylester	85/15	Medizinische Proben
PLA14	170	505	OH, COOH	85/15	Medizinische Proben
PLA15	4	13	Ester	50/50 (PDLLA)	Laborproben
PLA16	7	14	OH, Dodecylester	50/50 (PDLLA)	Medizinische Proben
PLA17	9	21	OH, Dodecylester	50/50 (PDLLA)	Medizinische Proben
PLA18	15	31	Ester	50/50 (PDLLA)	Laborproben
PLA19	21	44	Ester	50/50 (PDLLA)	Laborproben
PLA20	2	7	OH, COOH	50/50 (PDLLA)	Medizinische Proben
PLA21	2	10	OH, COOH	50/50 (PDLLA)	Laborproben
PLA22	6	19	OH, COOH	50/50 (PDLLA)	Medizinische Proben
PLA23	107	225	Ester	DL	Medizinische Proben

\* Die Molmassen wurden mittels SEC mit  $\text{CHCl}_3$  als Elutionsmittel bestimmt. Zur Kalibration wurde eine breite Kalibration auf Basis einer Kalibration mit Polystyrol-Standards verwendet (s. Kap.6.7.1). Die Korrekturfaktoren A = 0.38 und B = 1 wurden verwendet.

† Endgruppen gemäß den Angaben der Hersteller

PLA24	7	29	OH, OH (mit 1,4 Butandiol gestartet)	L	Laborproben
PLA25	2	3	OH, Methylester	L	Laborproben
PLA26	7	11	OH, Octylester	L	Laborproben
PLA27	6	11	OH, Octylester	L	Laborproben
PLA28	3	14	OH, Octylester	L	Laborproben

In Tab.8 sind die Endgruppen für einige Proben wie PDL02, PDL04 und PDL05 nicht genau bekannt. Zudem sind die angegebenen Endgruppen diejenigen, die sich theoretisch aus der Synthese ergeben sollten. Es ist jedoch bekannt, dass bei der Synthese, der Lagerung und Verarbeitung der Proben Nebenreaktionen wie z.B. Backbiting<sup>89</sup> oder Hydrolyse stattfinden können. Durch solche Nebenreaktionen können auch zyklische Polylactide oder Polylactide mit anderen Endgruppen entstehen.

Um die tatsächlich vorhandenen Endgruppen zu bestimmen wurde zunächst die MALDI-TOF-MS eingesetzt.

#### 5.2.1. Untersuchung mit MALDI-TOF-MS

Wie im Abs. 4.4 beschrieben wurde, ist die Charakterisierung der Endgruppen von Polymeren mittels MALDI-TOF-MS möglich. Hierzu vergleicht man die experimentell bestimmten Restmassen der Proben mit den berechneten Restmassen erwarteter Strukturen.

Beispielhaft wird dies am MALDI-TOF-Spektrum der Probe PLA16 gezeigt (siehe Abbildung 25). Laut Synthese sollte die Probe eine Dodecylester-Endgruppe am einen und eine Hydroxylgruppe am anderen Kettenende ( $C_{12}H_{25}O(C_3H_4O_2)_nHLi$ ) aufweisen.

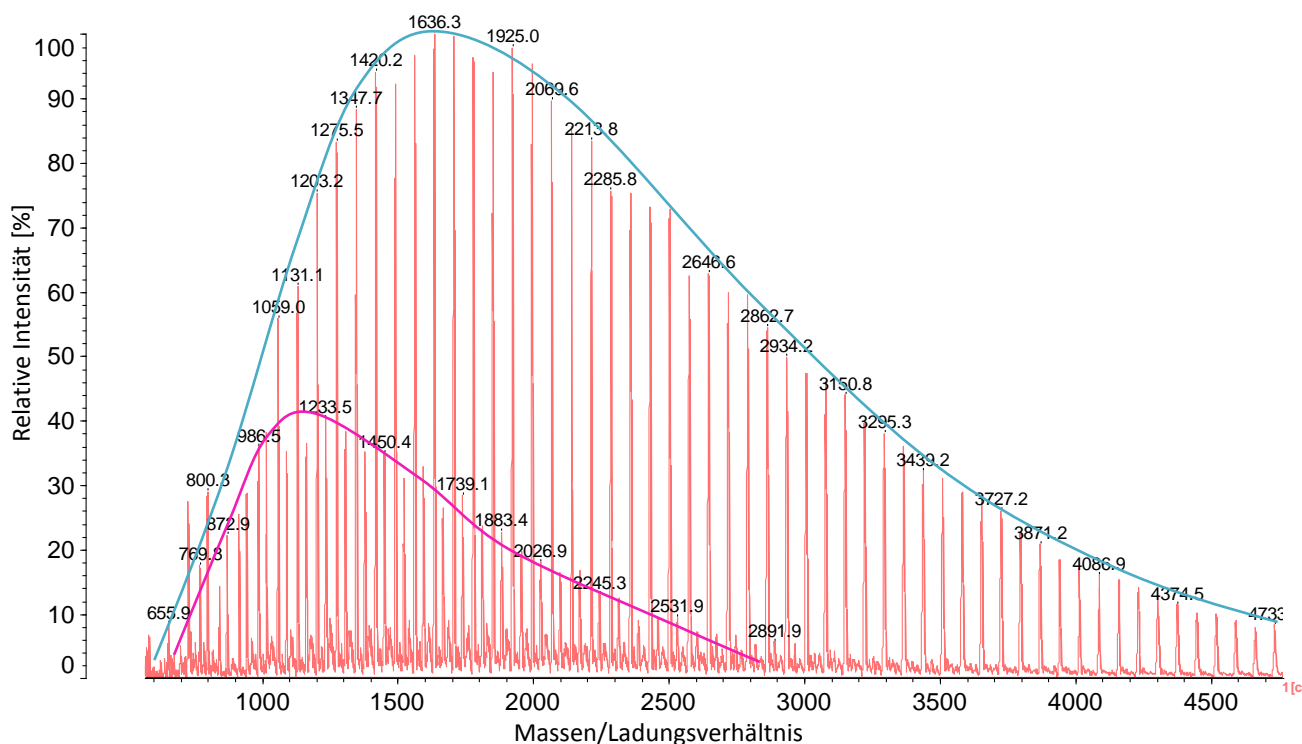


Abbildung 25: MALDI-TOF-Spektrum von PLA16. (Probenkonzentration: 4g/L; Lösungsmittel: THF)

Im Spektrum erkennt man deutlich zwei sich überlagernde Verteilungen, eine Hauptverteilung größerer Intensität im Bereich  $m/z = 700 - 4800$  (blau markiert), sowie eine Nebenverteilung geringerer Intensität im Bereich  $m/z = 700 - 2800$  (rosa markiert). Da für jede der beiden Verteilungen die Peaks eine Massendifferenz von 72 g/mol besitzen, weisen beide Verteilungen auf das Vorliegen von PLA hin.

Zur Endgruppenbestimmung wird nun die Restmasse der Endgruppen berechnet und mit den Molmassen der möglichen Endgruppen verglichen. Beispielhaft wird die Rechnung am Peak aus der Hauptverteilung mit der größten Intensität bei  $m/z = 1636.3$  durchgeführt. Zur Bestimmung der Restmasse wird zunächst die Molmasse des eingesetzten Gegenions abgezogen. Da im vorliegenden Fall zur verbesserten Kationisierung Lithiumchlorid verwendet wurde, wird von Lithium-Addukten ausgegangen. Zieht man von der Peakmasse die Atommasse eines Lithium-Atoms (6.941 g/mol) ab, erhält man einen Wert von 1629.359 g/mol. Zieht man nun ein ganzzahliges Vielfache der Monomereinheit (72.064 g/mol) ab, verbleibt nach Subtraktion von  $22 \times 72$  g/mol eine Restmasse, die geringer ist, als die Masse einer Monomereinheit. Im vorliegenden Fall beträgt die so ermittelte Restmasse 43.96 g/mol. Die Restmasse kann jedoch nicht eindeutig einer

Endgruppe zugeordnet werden. Nimmt man z.B. an, dass der Polymerisationsgrad der Kette 21 beträgt, ergibt sich eine Restmasse von 116.02 g/mol bei einem angenommenen Polymerisationsgrad von 20 Monomereinheiten eine Restmasse von 188.08 g/mol. Da laut Herstellerangabe diese Probe eine Dodecylester- und eine Alkohol-Endgruppe haben sollte, ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}$ - und  $-\text{H}$ ) ergibt sich für die Restmasse ein Wert von 186.34 g/mol. Diese weicht nur um 2 g/mol von der für einen Polymerisationsgrad von 20 ermittelten Restmolmasse von 188.08 g/mol ab. Da abhängig von der Qualität der verwendeten Kalibration des Massenspektrometers eine Abweichung von 2.5 g/mol möglich ist, ist davon auszugehen, dass die Hauptverteilung durch ein PLA mit Dodecyl- und Alkohol-Endgruppen hervorgerufen wird.

Um den Vergleich der Restmassen für unterschiedliche Strukturen zu vereinfachen, wurden die theoretischen Restmassen für potentielle Endgruppenkombinationen berechnet und in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 9: Molekulargewichte der möglichen Endgruppen.

Endgruppe	Strukturformel des PLA	Molmasse der Endgruppen [g/mol]	Korrespondierende Restmasse [g/mol]
Zyklisches PLA	$(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n$	0	0
Carbonsäure, OH	$\text{HO}(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n\text{H}$	18.02	18.02
Methylester, OH	$\text{CH}_3\text{O}(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n\text{H}$	32.04	32.04
Butylester, OH	$\text{C}_4\text{H}_9\text{O}(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n\text{H}$	74.12	2.06
Octylester, OH	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n\text{H}$	130.23	58.17
Nonylester, OH	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n\text{H}$	144.26	0.13
Dodecylester, OH	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n\text{H}$	186.34	42.21
Butandiol gestartetes PLA	$\text{HO}(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n\text{C}_4\text{H}_8(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_m\text{OH}$	90.12	18.05

Für die Nebenverteilung der Probe PLA16 berechnet sich eine Restmasse von 1.48 g/mol. Vergleicht man diese mit den Restmassen der unterschiedlichen Endgruppenkombinationen in Tabelle 9 und lässt eine Abweichung von 2.5 g/mol zu, so kann es sich bei der Nebenverteilung um Zyklen, Kombinationen aus Butylester- und OH- bzw. aus Nonylester- und OH-Endgruppen handeln. Im vorliegenden Fall ist die Nebenverteilung sehr wahrscheinlich auf zyklisches PLA zurückzuführen, da es für die Zugabe eines zusätzlichen Alkohols keine sinnvollen Argumente gibt. Das zyklische PLA entsteht vermutlich durch Backbiting-Reaktion entweder bei der Synthese oder bei der Lagerung der Probe.



Wie in der Einleitung erwähnt, wurden die bisher beschriebenen MALDI-Untersuchungen an Polylactiden nur an PLAs mit Molekulargewichten bis ca. 10 kDa und meist an engverteilten Proben durchgeführt. Die Peakintensitäten in MALDI-Spektren nehmen jedoch mit steigendem Molekulargewicht und steigender Dispersität ab. Um zu überprüfen ob sich die industriell hergestellten Proben, die eine Molmasse von ca. 70 kDa und eine Dispersität von ca. 2 aufweisen, dennoch zur Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS eignen, wurde die Probe PLA1 vermessen. Das erhaltene MALDI-Spektrum ist in Abbildung 26 dargestellt.

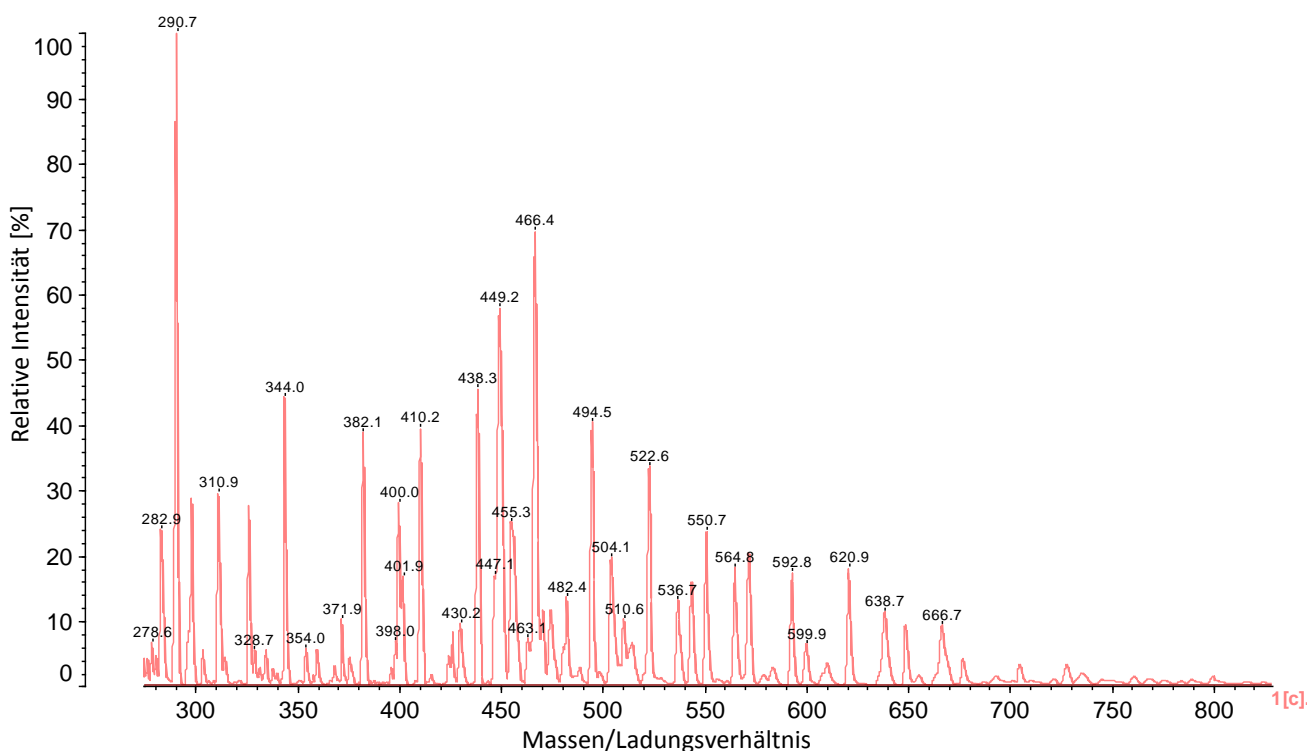


Abbildung 26: MALDI-Spektrum der Probe PLA1. (Probenkonzentration: 4g/L; Lösungsmittel: THF)

Im Spektrum werden viele Peaks im Bereich von 280-700 g/mol beobachtet. Es lässt sich jedoch keine Peakserie mit Abständen von 72 g/mol für PLA identifizieren. Die hier beobachteten Peaks werden somit offenbar nicht durch Polylactid hervorgerufen sondern werden durch die zur Messung verwendete Matrix hervorgerufen, da diese Peaks auch ohne Zugabe von PLA zu finden sind. Dies weist darauf hin, dass die Probe PLA1 ein zu hohes Molekulargewicht und/oder eine zu große Dispersität aufweist um sie mit MALDI-TOF-MS direkt untersuchen zu können. Somit ist die MALDI-TOF-MS für typische technische Polymerproben ohne weitere Probenvorbereitung nicht einsetzbar.

Da, wie oben gezeigt, die technisch hergestellten Polylactide aufgrund ihrer Molmassen einer direkten Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS nicht unterzogen werden können, sollten sie zunächst gezielt abgebaut werden. Durch den Abbau sollten niedermolekulare Bruchstücke erzeugt werden, die direkt mit MALDI-TOF-MS untersucht werden können.

Aus der Literatur ist es bekannt, dass man durch einen alkalischen Abbau in Wasser oder Methanol PLA vollständig zum Monomer abbauen kann.<sup>90</sup> Dies wird verwendet, um z.B. die mittleren stereochemischen Zusammensetzungen von PLA zu bestimmen, indem man die durch Abbau erhaltenen Milchsäurederivate mittels Gaschromatographie auf einer chiralen Säule trennt. Bei den beschriebenen Abbaumethoden wird Wasser bzw. Methanol in großem Überschuss eingesetzt um einen vollständigen Abbau zu gewährleisten. Unter Verwendung eines Wasserunterschusses oder von geringen Mengen an Methanol sollte sich ein partieller Abbau realisieren lassen. Durch den Abbau mit Methanol sollten aus jeder Polylactid-Kette viele Bruchstücke mit Alkohol- und Methylester-Endgruppen entstehen, die aus Abbaureaktionen in der Kettenmitte resultieren. Daneben sollten für jede Kette jeweils zwei Bruchstücke mit Information über die ursprünglich vorhandenen Endgruppen auftreten (siehe Abbildung 27). Im MALDI-Spektrum einer abgebauten Probe sollte man somit eine Verteilung großer Intensität für die mittleren Bruchstücke, und zwei Verteilungen geringerer Intensität für die beiden Bruchstücken mit den Endgruppen sehen, falls sich diese in Ihren Restmassen von den mittleren Bruchstücken unterscheiden. Auf diese Weise könnte es gelingen auch für die hochmolekularen technischen PLAs Informationen über die Endgruppen zu gewinnen.

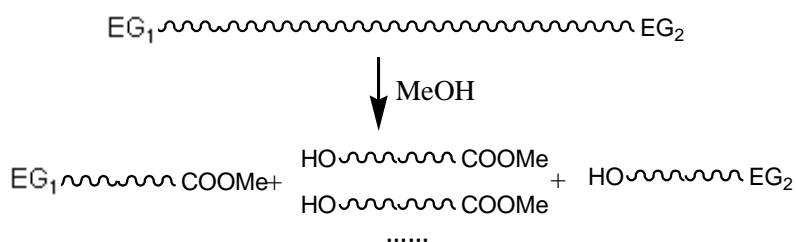


Abbildung 27: Reaktionsschema für den partiellen Abbau von Polylactiden durch Methanol mit Natriumhydroxid als Katalysator. (EG<sub>1</sub> und EG<sub>2</sub> sind die ursprünglichen Endgruppen)

Entsprechend diesen Überlegungen wurde zunächst versucht, geeignete experimentelle Bedingungen zu identifizieren um die PLA-Proben mit einer methanolischen Lösung von Natriumhydroxid zu niedrigeren Molmassen abzubauen, die eine Charakterisierung der

Bruchstücke mittels MALDI-TOF-MS ermöglichen. In der Literatur, bei welcher PLA zum Monomer abgebaut wird, werden PLA-Granulate direkt mit der Wasser- oder MeOH-Lösung versetzt und die Lösung wird so lange gerührt bis das PLA nach dem Abbau vollständig gelöst ist. Da PLA in Wasser oder Methanol unlöslich ist, findet die Reaktion offenbar von der Oberfläche aus statt. Hierdurch liegen offenbar abgebaute, gelöste Probenbestandteile neben unversehrten Ketten des Granulates vor. Im Vergleich dazu sollte im Fall dieser Arbeit die Reaktion in einer homogenen Lösung stattfinden, damit die Ketten möglichst gleiche Wahrscheinlichkeit für eine statistische Spaltung aufweisen, und die Dispersität der Proben durch den Abbau nicht dramatisch steigt. Im Falle heterogener Reaktionsführung könnten die gelösten Ketten Mehrfachspaltungen unterliegen, während ungelöste Polymerbestandteile nicht gespalten werden. Aus diesem Grund wurde das PLA zuerst in THF gelöst und dann mit der methanolischen NaOH-Lösung versetzt. Hierzu wurde die Menge der Methanol-Lösung variiert, um unterschiedliche Molekulargewichte zu erhalten. Zur Prüfung des Lösungsansatzes wurde die Probe PLA1 umgesetzt und die Reaktionsprodukte in der SEC vermessen um die mittleren Molekulargewichte zu bestimmen. Die genaue Vorschrift der Abbaureaktionen wird in Kap.6.3.1 wiedergegeben. In Abbildung 28 sind die erhaltenen zahlenmittleren Molekulargewichte der abgebauten Proben gegen die Menge der methanolischen Lösung von NaOH aufgetragen.

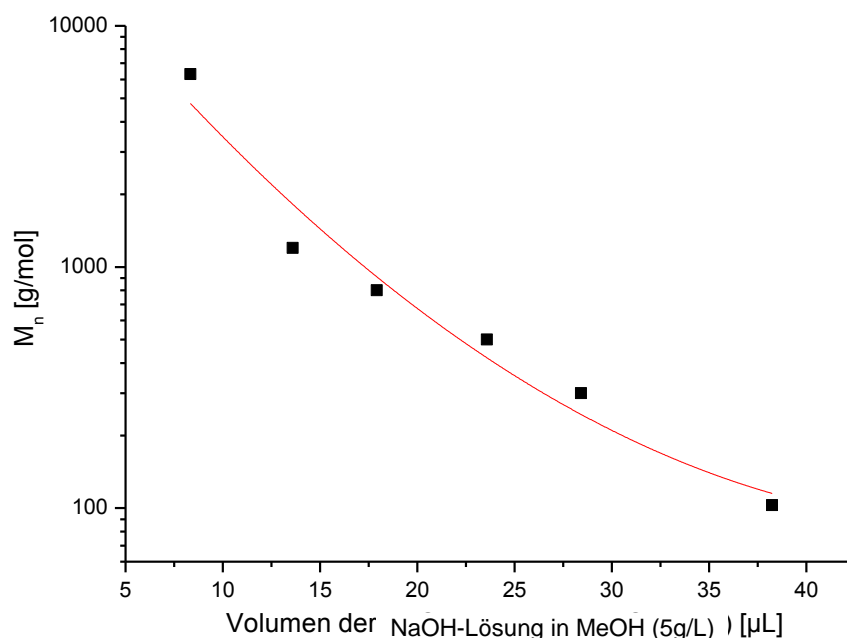


Abbildung 28: Auftragung des zahlenmittleren Molekulargewichtes der Abbauprodukte von PLA1 (PLA-Abbau7-12) gegen die Menge der methanolischen Lösung von NaOH. (Die SEC-Messungen wurden in THF als Elutionsmittel mit

---

der Anlagenkonfiguration Hochmolekular-SEC, die im Kap.6.7.1 beschrieben wird, durchgeführt.)

Wie man erkennen kann, ist der partielle Abbau erfolgreich. Durch Variieren der Menge der MeOH-Lösung lässt sich, ausgehend von einem mittleren Molekulargewicht von 74 kDa, das Molekulargewicht gezielt so einstellen, dass die erhaltenen Molmassen zur Untersuchung mittels MALDI-TOF-Untersuchungen geeignet sind. Jedoch wurde bemerkt, dass die theoretischen Molekulargewichte, die aus dem Mengenverhältnis von PLA und MeOH berechnet wurden, deutlich geringer sind als die durch SEC ermittelten Molekulargewichte (s. Tabelle 14). Für dieses Phänomen gibt es zwei mögliche Erklärungen: Zum einen könnte die Reaktion mit Methanol nur unvollständig ablaufen, da es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt. Zum anderen greift das Methanol möglicherweise nicht statistisch die PLA-Ketten an, sondern bevorzugt am Kettenende, wodurch kleine PLA-Oligomere entstehen. Diese eluieren in der SEC zusammen mit dem Lösungsmittelpeak und werden daher nicht erkannt. In der Konsequenz ergibt sich aus dem Verlust der niedermolekularen Anteile ein zu hohes Molekulargewicht. Dennoch lassen sich durch Verwendung geeigneter Mengen an methanolischer NaOH die Molekulargewichte der Abbauprodukte steuern.

Bei den Abbauversuchen wurde auch die Reaktionsdauer variiert. Hierzu wurden unter sonst identischen Bedingungen nach der Zugabe der methanolischen NaOH-Lösung zu unterschiedlichen Zeiten Aliquote der Reaktionsmischungen entnommen, auf eine theoretische Konzentration von 4 g/L verdünnt und in der SEC vermessen. In Abbildung 29 sind die erhaltenen Molekulargewichte der Proben gegen die Reaktionszeiten aufgetragen. Wie man erkennt, ändern sich die Molekulargewichte kaum als Funktion der Reaktionszeit. Da die kürzesten Proben nach 20 Minuten entnommen wurden, bedeutet dies, dass der Abbau bei Raumtemperatur schon nach 20 Minuten vollständig ist.

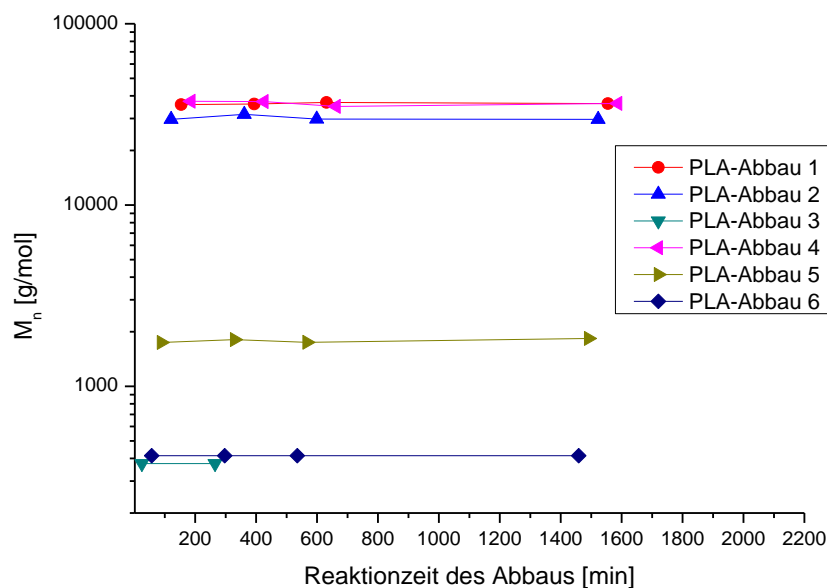


Abbildung 29: Auftragung der zahlenmittleren Molekulargewichte der abgebauten Proben gegen Reaktionszeiten der Abbaureaktion. Die SEC-Messungen wurden in THF als Elutionsmittel mit der Anlagenkonfiguration Hochmolekular-SEC (s. Kap.6.7.1) gemessen.

Nach dem erfolgreichen Abbau wurden die abgebauten Proben nun mittels MALDI-TOF-MS untersucht. In Abbildung 30 ist exemplarisch das MALDI-TOF-Spektrum einer aus PLA1 abgebauten Probe gezeigt.

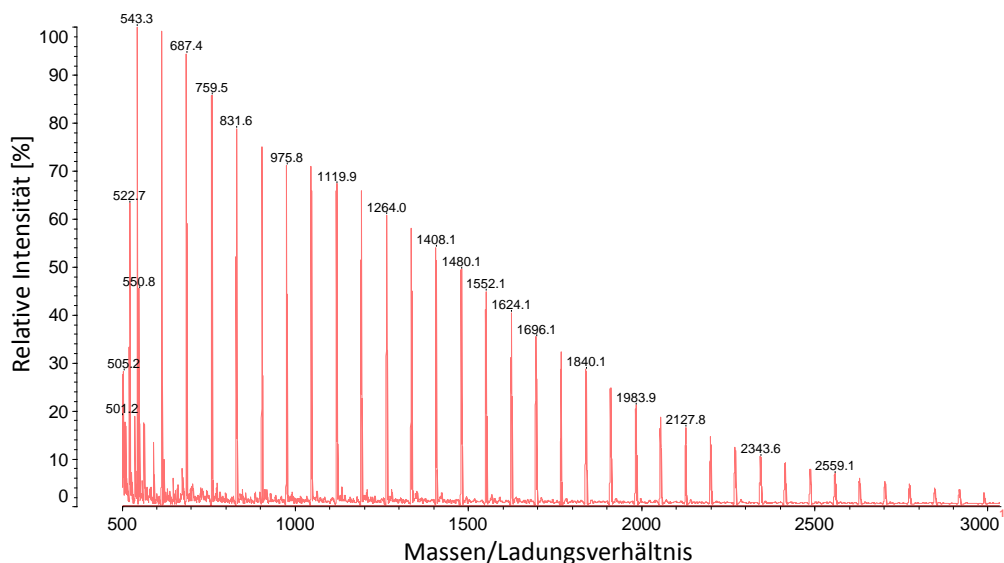


Abbildung 30: MALDI-Spektrum der partiell abgebauten Probe PLA1 (PLA-Abbau8). (Probenkonzentration: 4g/L; Lösungsmittel: THF)

Im Spektrum erkennt man eine Verteilung mit den äquidistanten Peakabständen von 72 m/z, wie es für Polylactide zu erwarten ist. Durch die Berechnung der Restmassen kann diese Verteilung einem Polylactid mit Methylester- und Alkoholendgruppen zugeordnet werden. Sie entspricht somit der erwarteten Verteilung für die Bruchstücke, die aus der Mitte der PLA-Kette resultieren sollten (siehe Abbildung 27). Neben dieser Verteilung wurden jedoch zusätzliche Verteilungen für die beiden Bruchstücke, die aus den Kettenenden resultieren, erwartet. Diese können aber im Spektrum nicht identifiziert werden. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der niedrigen Konzentration dieser Bruchstücke.

### MALDI-TOF-MS hochmolekularer Proben nach partiellem Abbau mit Polyethylenglykol-monomethylether 350

Offenbar sind die Intensitäten der Abbauprodukte, welche Informationen über die ursprünglichen Endgruppen tragen, so gering, dass deren Verteilungen in MALDI-TOF-Spektren nicht erkannt werden können. Daher wurde nach einer Abbauprozedur gesucht die es gestattet, die Bruchstücke mit den ursprünglichen Endgruppen von den anderen Abbauprodukten, die keine Informationen zu den Endgruppen liefern, zu separieren um sie anschließend mittels MALDI-TOF-MS untersuchen zu können. Eine Möglichkeit könnte die Verwendung makromolekularer Alkohole, wie z.B. Polyethylenglykol-monomethylether (als PEG abgekürzt), bieten. Durch den Abbau mit PEG sollte ein reines Polylactid mit der Endgruppe auf der Carbonyl-Seite (EG1) entstehen, während die anderen Bruchstücke als PLA-PEG-Copolymere vorliegen sollten (siehe Abbildung 31). Aufgrund der unterschiedlichen Polaritäten von PEG und PLA sollte sich das reine PLA von den PLA-PEG-Copolymeren mittels HPLC trennen lassen, und anschließend mittels MALDI-TOF-MS untersuchen lassen. Auf diese Weise könnte man die Endgruppe auf der Carbonyl-Seite (EG1), also die verwendeten Startalkohole, identifizieren.

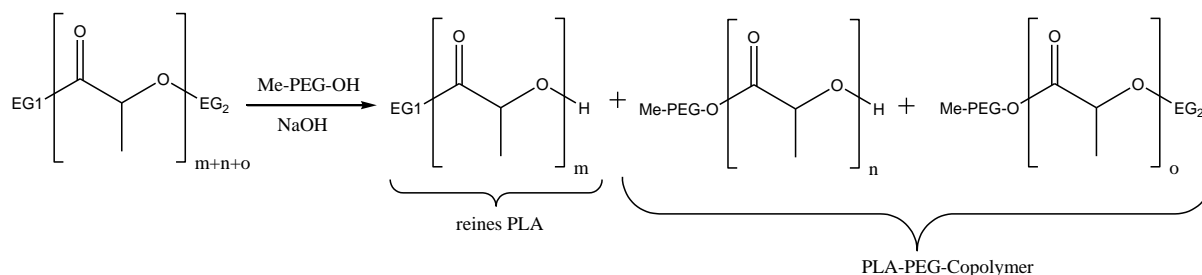


Abbildung 31: Reaktionsschema der Reaktion von PLA mit PEG-Monomethylether unter alkalischer Bedingung.

Gemäß der oben beschriebenen Strategie wurde daher versucht, die technische Probe PLA1 mit PEG abzubauen. Hierzu musste zunächst ein PEG mit geeignetem Molekulargewicht ausgewählt werden. Das Molekulargewicht von PEG sollte einerseits groß genug sein, um einen hinreichenden Unterschied im Adsorptionsverhalten zu PLA zu bewirken. Andererseits sollte es nicht zu groß sein, weil mit steigendem Molekulargewicht des PEG die Konzentration der Alkohol-Endgruppe des PEG abnimmt und somit bei konstanter PLA-Konzentration die Reaktion viel langsamer ablaufen sollte. Außerdem nimmt bei gleicher molarer Konzentration des PEG mit steigendem Molekulargewicht der Gewichtsanteil der interessierenden PLA-Bruchstücke ab, was die Detektion wiederum erschwert. Daher wurde zunächst ein PEG-monomethylether mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 350 g/mol (unten als PEG350 abgekürzt) verwendet.

Analog zum Abbau mit MeOH wurde die Lösung von PEG350 in MeOH mit NaOH versetzt und zur PLA-Lösung hinzugefügt. Die Mengen an NaOH und der PEG-Lösung wurden variiert um nach dem Abbau unterschiedliche Molekulargewichte zu erzielen (s. Kap.6.3.2). Die abgebauten Proben wurden anschließend mittels SEC bezüglich ihrer Molekulargewichtsverteilung charakterisiert. Die so erhaltenen zahlenmittleren Molekulargewichte sind in Abbildung 32 gegen die zugesetzte Menge an PEG350 aufgetragen. Analog zum Abbau mit methanolischer NaOH wird eine Abnahme der Molekulargewichte mit Zunahme der Menge von PEG350 beobachtet.

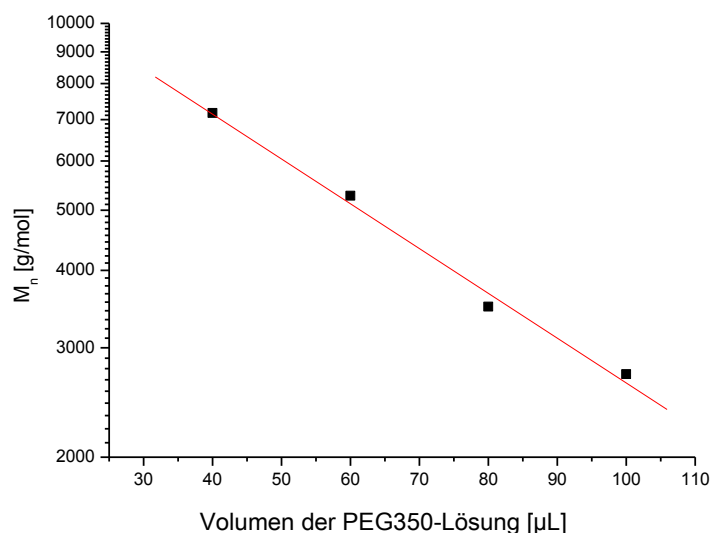


Abbildung 32: Auftragung der Molekulargewichte der Abbauprodukte von PLA1 (PLA-PEG1-4) gegen die Menge der PEG350-Lösung. (Die Messungen wurden in THF als Elutionsmittel mit der Anlagenkonfiguration Hochmolekular-SEC im Kap.6.7.1 gemessen.)

Nach dem erfolgreichen Abbau wurde versucht, das reine PLA mit der Endgruppe EG<sub>1</sub> (s. Abbildung 31) von den anderen Abbauprodukten, nämlich den PLA-PEG-Copolymeren, mittels HPLC abzutrennen. Hierzu wurde als stationäre Phase reines Kieselgel verwendet. Zunächst wurden PLA1, PEG350 und die abgebauten Proben in reinem CHCl<sub>3</sub> vermessen, da dieses ein gutes Lösungsmittel für alle Proben ist. In keinem Falle konnte eine Elution beobachtet werden, was darauf hinweist, dass in CHCl<sub>3</sub> alle Proben auf der Säule adsorbiert werden. Da diese Säule eine Normalphasensäule ist, sollte nun ein stärker polarer Eluent verwendet werden, um die Proben zu desorbieren. Unter Verwendung von reinem THF konnten alle Proben eluiert werden. Um PLA und PLA-PEG-Copolymere aufgrund ihrer unterschiedlichen Adsorptionsstärken zu trennen, wurde daher ein Gradient von CHCl<sub>3</sub> nach THF verwendet. Die erhaltenen Elugramme sind in Abbildung 33 dargestellt.

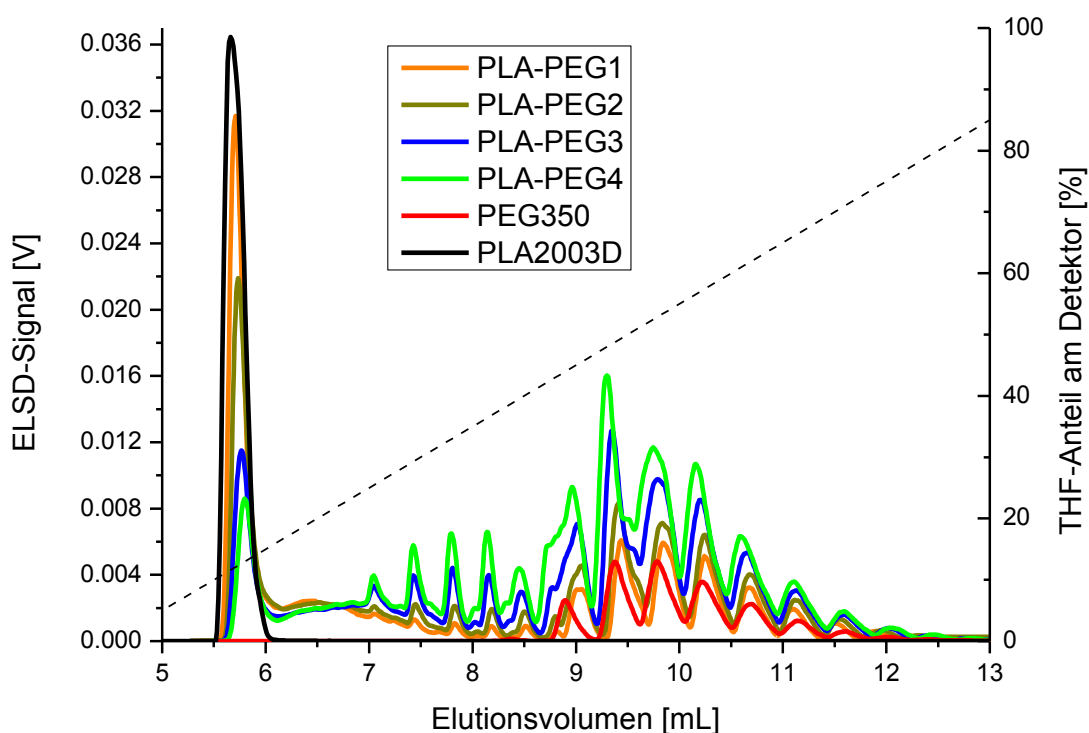


Abbildung 33: Elugramme des PLA1, PEG350 und der abgebauten Proben PLA-PEG1-4 (s. Kap.6.3.2) in einem Gradienten von CHCl<sub>3</sub> nach THF auf einer Nucleosil-Säule (1000Å, 7µ) (Proben in CHCl<sub>3</sub> gelöst; c<sub>PLA</sub> = 1 mg/mL; Injektionsvolumen = 50 µL; T = 35 °C; Flussrate = 1 mL/min; Mobile Phase: 0-1 mL CHCl<sub>3</sub>/THF = 100/0, 11-12 mL CHCl<sub>3</sub>/THF = 100/100; 12.01 mL CHCl<sub>3</sub>/THF = 100/0; 18 mL nächste Injektion). Die schwarze gestrichelte Linie gibt den THF-Anteil im Eluenten am Detektor wieder, der nach Gleichung 25 auf Seite 119 berechnet wurde.



Aus der Abbildung ist zu sehen, dass PLA1 (schwarz) früher eluiert als PEG350 (rot), was darauf hinweist, dass PEG350 stärker adsorbiert als PLA1 wird. Die Aufspaltung des Peaks von PEG350 resultiert mit hoher Wahrscheinlichkeit aus den unterschiedlichen PEG-Polymerisationsgraden, wobei die Ketten mit höheren Polymerisationsgraden stärker adsorbiert werden und deshalb später eluieren.

Weiterhin erkennt man, dass jede abgebaute Probe einen Peak beim Elutionsvolumen von 5.7 mL, wo auch PLA1 eluiert, aufweist. Es kann vermutet werden, dass dieser Peak zu reinem PLA korrespondiert. Bei größeren Elutionsvolumen zeigen sich jeweils noch weitere Peaks. Dabei eluieren einige der Peaks dort, wo das reine PEG 350 eluiert. Andere Signale, die sich weder in den Chromatogrammen des PLA noch des reinen PEG finden, treten im Bereich von 6–9 mL auf. Diese Peaks korrespondieren somit wahrscheinlich zu den gebildeten PLA-PEG-Copolymeren.

Aus Abbildung 33 erkennt man weiterhin, dass der Peak bei 5.7 mL nicht sauber von den anderen Peaks abgetrennt ist. Wahrscheinlich sind die in PEG350 enthaltenen kleinen Oligomere verantwortlich, die ebenfalls mit PLA reagieren und Copolymere bilden können. Aufgrund der geringen PEG-Blocklänge werden diese PLA-PEG-Copolymere im Vergleich zum reinen PLA nur geringfügig stärker adsorbiert, wodurch es zu einer leichten Überlappung mit dem PLA-Peak kommt. Um eine bessere Trennung zu erzielen, wurde daher der Gradient weiter optimiert. Abbildung 34 zeigt die Chromatogramme, die im optimierten Gradienten erhalten wurden.

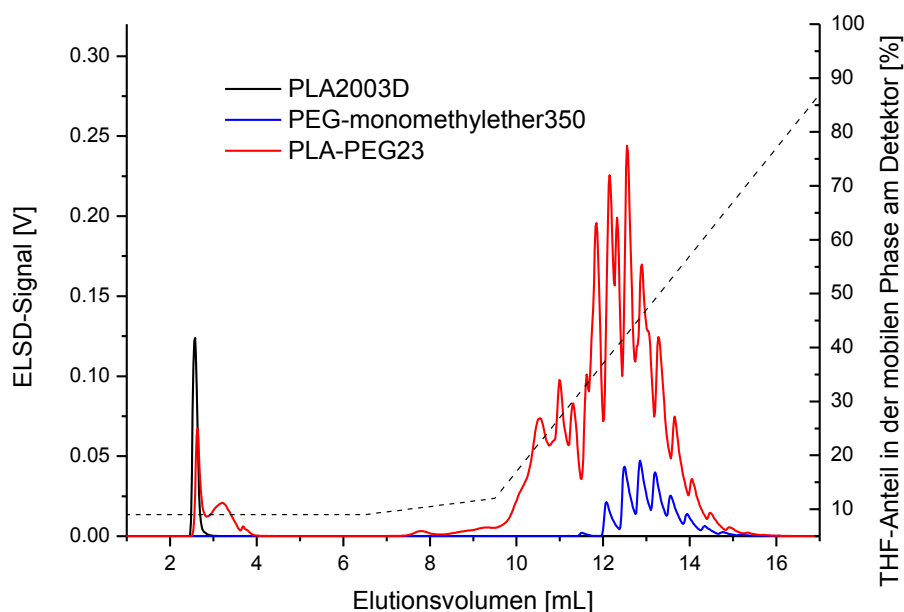
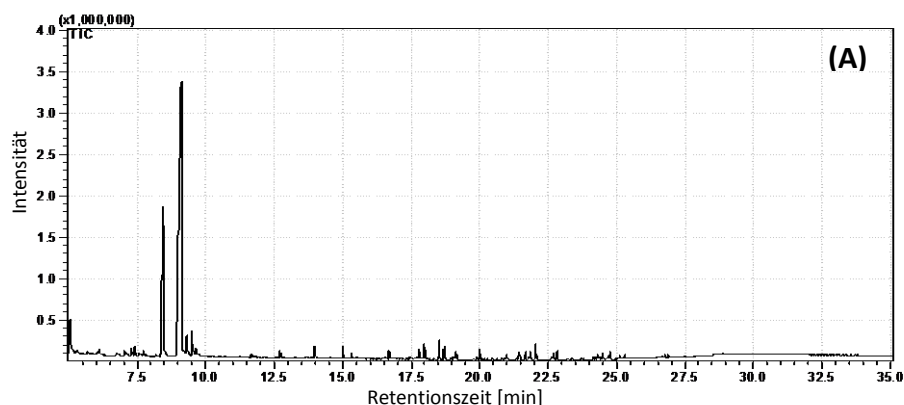


Abbildung 34: Elugramme für PLA1, PEG350 und eine abgebaute Probe PLA-PEG4 im optimierten  $\text{CHCl}_3/\text{THF}$ -Gradienten. (Stationäre Phase: Nucleosil (1000Å, 7 $\mu$ ); Proben in  $\text{CHCl}_3$  gelöst;  $c_{\text{PLA}}$  = 4 mg/mL; Injektionsvolumen =

100  $\mu\text{L}$ ;  $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Flussrate = 1 mL/min; Mobile Phase: 0–3 mL  $\text{CHCl}_3/\text{THF} = 91/9$ , 6 mL  $\text{CHCl}_3/\text{THF} = 88/12$ ; 14.8 mL  $\text{CHCl}_3/\text{THF} = 88/12$ ; 14.9 mL  $\text{CHCl}_3/\text{THF} = 91/9$ ; 24 mL nächste Injektion). Die schwarze gestrichelte Linie gibt den THF-Anteil im Eluenten am Detektor an, der nach Gleichung 25 auf Seite 119 berechnet wurde.

In der Abbildung sieht man, dass trotz Optimierung die abgebaute Probe zwei überlappende Peaks bei 9% THF (also um 3 mL Elutionsvolumen) zeigt, wobei ein Peak beim gleichen Elutionsvolumen wie PLA1 und der andere bei geringfügig höherem Elutionsvolumen eluiert. Bei höheren THF-Anteilen in der mobilen Phase eluieren noch weitere Peaks, die wahrscheinlich auf die PLA-PEG-Copolymeren und überschüssiges PEG zurückzuführen sind. Die Frage war nun, ob die beiden Peaks bei 9% THF vom reinen PLA kommen oder auch noch PEG enthalten. Aufgrund der sehr geringen injizierten Probenmengen und der geringen Peakintensitäten der interessierenden Peaks müsste man zur Klärung dieser Frage entweder größere Menge aufwändig fraktionieren, oder eine sehr empfindliche analytische Methode einsetzen.

Die Pyrolyse-GC/MS ist eine solch empfindliche Methode, mit der sich prinzipiell die Zusammensetzung qualitativ und semiquantitativ bestimmen lassen sollte. Um zu überprüfen ob Py-GC-MS für die Bestimmung der Zusammensetzung von PLA/PEG-Mischungen geeignet ist, wurde zunächst reines PLA (PLA1), reines PEG350 und eine 1:1-Mischung davon vermessen. Die Pyrogramme der Proben sind in Abbildung 35 dargestellt.



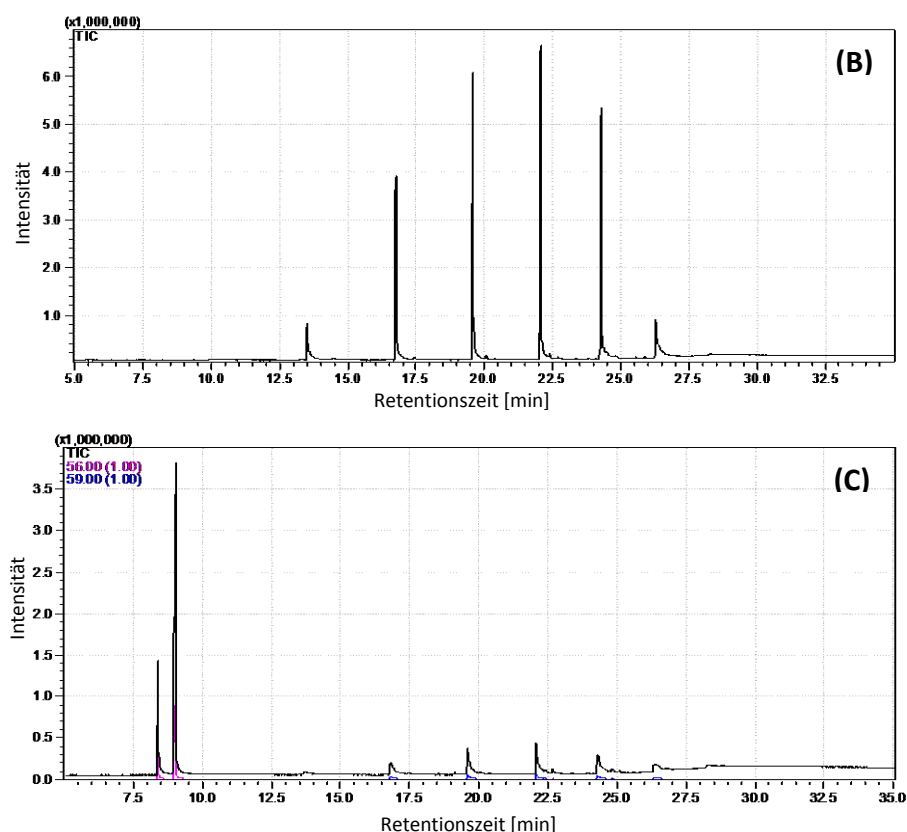


Abbildung 35: Pyrogramme der Probe PLA1 (A), PEG350 (B) und einer 1:1-Mischung der beiden Proben (C).

Die Probe PLA1 zeigt im Pyrogramm zwei Peaks bei den Retentionszeiten (RT) 8,5 min und 9,0 min. Durch Datenbankabgleich der dazu korrespondierenden Massenspektren werden die beiden Peaks als *meso*- und *iso*-Lactide identifiziert.<sup>91, 92</sup> Im Pyrogramm von PEG350 erkennt man 6 Peaks bei Retentionszeiten zwischen 13 min und 28 min, die laut den zugehörigen Massenspektren zu Dimer, Trimer, Tetramer, Pentamer und Hexamer von PEG-monomethylether korrespondieren. Diese Oligomere sind entweder in der originalen Probe enthalten oder wurden durch Pyrolyse gebildet. Bei der Mischung von PLA und PEG werden Peaks von beiden Polymeren beobachtet, wobei die Peakintensitäten der PEG-Peaks viel geringer sind als die des PLA, da sich die gesamte Probenmenge des PEGs auf mehrere Peaks verteilt.

Abbildung 36 zeigt die Massenspektren des PLA-Peaks bei 9,0 min bzw. des PEG-Peaks bei 19,5 min. Wie man erkennt, ist das Massensignal bei  $m/z = 56$  selektiv für PLA, und kann somit zur Identifizierung und Quantifizierung des PLA herangezogen werden. Für die Identifizierung und Quantifizierung des PEG ist die Massenspur  $m/z = 59$  geeignet, da sie in PLA nicht auftritt und somit selektiv für PEG ist.

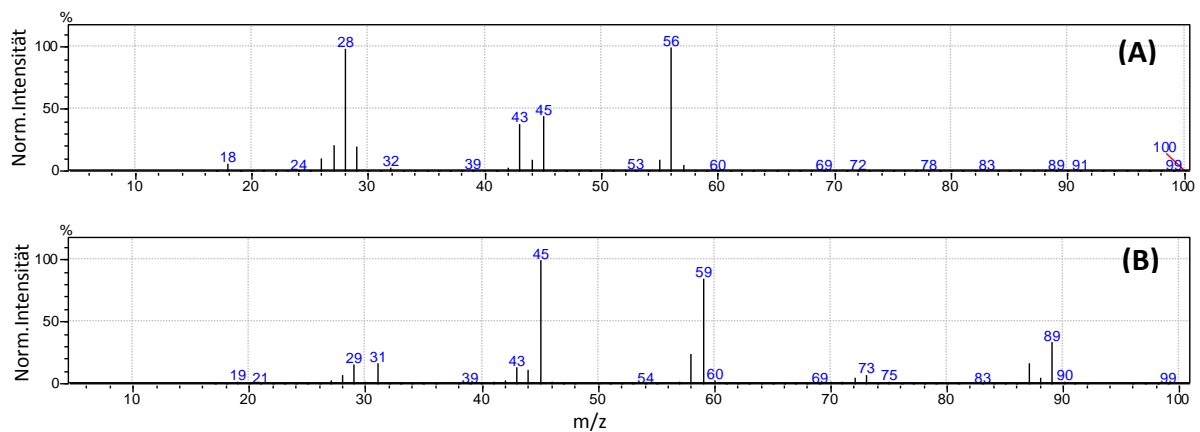


Abbildung 36: Massenspektrum des Peaks von PLA bei 9.0 min **(A)** und des Peaks von PEG bei 19.6 min **(B)**.

Aus den Massenspektren und den Chromatogrammen kann geschlossen werden, dass sich PLA und PEG mittels Py-GC-MS unterscheiden lassen und in einer 1:1-Mischung beide Komponenten nachgewiesen werden können. Es galt nun die Frage zu klären, bis zu welchen Anteilen PLA in PEG bzw. umgekehrt nachgewiesen werden können. Zur Überprüfung dieser Frage wurden PLA und PEG in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und die so erhaltenen Mischungen vermessen. Durch Auftragung der relativen Peakfläche gegen die Probenzusammensetzung wurde geprüft ob ein quantitativer Zusammenhang zwischen Flächenanteil und Massenverhältnisse besteht. Zur Berechnung der Peakflächen wurden dabei nicht die TIC-Kurven, sondern die selektiven Massenspuren, nämlich  $m/z = 56$  für PLA bzw.  $m/z = 59$  für PEG, herangezogen, um Einflüsse von Verunreinigungen oder des Rauschens zu minimieren.

Die nachfolgende Tabelle gibt die Massen- und Peakflächenanteile von PEG wieder. In Abbildung 37 werden die entsprechenden Werte graphisch dargestellt.

Tabelle 10: Flächenanteile von PEG in den PLA-PEG-Blend-Mischungen.

Massenverhältnis PLA/PEG	PEG-Anteil in Gew. [%]	Flächenanteil $A_{59}/(A_{56} + A_{59})$
0/100 (PEG)	100	1
1/50	98	0.99
1/10	90.9	0.92
1/5	83.3	0.82
½	66.7	0.69
1/1	50	0.36
2/1	33.3	0.23
5/1	16.7	0.11
10/1	9.1	0.09
15/1	6.3	0.04
20/1	4.8	0
30/1	3.2	0
40/1	2.4	0
50/1	2	0
100/0 (PLA)	0	0

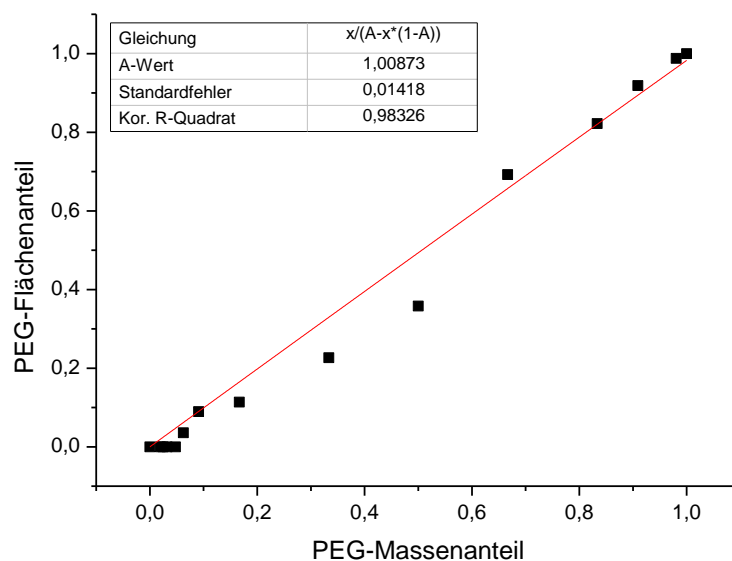


Abbildung 37: Auftragung der Flächenanteile der PEG-Peaks gegen Massenanteile von PEG in den Blendmischungen.

Wie man trotz einiger Streuung erkennt, nimmt der Flächenanteil der PEG-Peaks mit dem PEG-Massenanteil zu. Um eine quantitative Kalibrierkurve erstellen zu können, wurden die Messwerte durch eine geeignete Funktion angepasst. Hierzu wurde angenommen, dass die jeweilige Peakfläche proportional zur injizierten Probenmenge ist:

$$A_{59} = R_1 \cdot m_{PEG}$$

$$A_{56} = R_2 \cdot m_{PLA}$$

Gleichung 21

Darin sind  $A_{PEG}$  bzw.  $A_{PLA}$  die Peakfläche von PEG bzw. PLA,  $m_{PEG}$  bzw.  $m_{PLA}$  die Masse von PEG bzw. PLA,  $R_1$  der Responsefaktor von PEG und  $R_2$  der Responsefaktor von PLA.

Damit lässt sich der Flächenanteil von PEG ( $y$ ) beschreiben als:

$$y = \frac{A_{59}}{A_{59} + A_{56}} = \frac{R_1 \cdot m_{PEG}}{R_1 \cdot m_{PEG} + R_2 \cdot m_{PLA}} = \frac{R_1 \cdot x}{R_1 \cdot x + R_2 \cdot (1-x)} = \frac{x}{x + \frac{R_2}{R_1} \cdot (1-x)} = \frac{x}{A - x \cdot (1-A)}$$

Gleichung 22

$$(A = \frac{R_2}{R_1}, \quad x = \text{Massenanteil des PEG in der Blendmischung})$$

Durch die oben beschriebene nichtlineare Funktion konnten die Messpunkte in Abbildung 37 angepasst werden. Bei Kenntnis vom Parameter A kann man nun für unbekannte Proben aus dem Flächenanteil dem dazugehörigen Gewichtsanteil bestimmen.

Aus Tabelle 10 ist weiterhin zu erkennen, dass bei einem PEG-Massenanteil unter ca. 5 % kein PEG-Peak mehr identifiziert werden kann. Ein Massenanteil von 5 % entspricht unter den verwendeten Messbedingungen einer in das System eingebrachten Menge von ca. 2.5 µg PEG. Daher liegt die Nachweisgrenze für PEG unter den verwendeten Messbedingungen bei ca. 2.5 µg. Im Vergleich dazu kann PLA bis zu 2 %-Massenanteil, entsprechend einer Masse von 1 µg immer noch nachgewiesen werden. Weiterhin sieht man in Abbildung 37, dass die Punkte im mittleren Bereich bei einem PEG-Massenanteil zwischen 0.3 und 0.7 durch die nichtlineare Funktion nicht gut angepasst werden können. Der Grund für die große Abweichung ist wahrscheinlich, dass jede Blendmischung nur einmal vermessen wurde. Da beim Massenspektrometer eine große Schwankung der Peakintensitäten vorkommen kann, sollten für jede Probe mehrere Wiederholungsmessungen durchgeführt werden um die Fehler herauszumitteln<sup>57</sup>. An dieser Stelle wurde die Kalibration nicht weiter optimiert, da das Ziel dieser Untersuchungen darin bestand zu bestimmen ob sich in den HPLC-Fractionen reines PLA oder PLA-PEG-Copolymer enthalten ist.

Nach der Bestimmung der Nachweisgrenzen konnten nun die abgebauten Proben in der HPLC (Abbildung 34) fraktioniert und die Fraktionen mit Py-GC-MS untersucht werden. Um hinreichende Probenmengen zu erhalten wurde jede Probe drei Mal fraktioniert, wobei jeweils 10 Fraktionen genommen wurden. Die Fraktionsgrenzen sind in Abbildung 38

dargestellt. Die Fraktionen wurden anschließend zur Trockne eingengt, mit 60  $\mu\text{L}$  THF aufgenommen, in den Pyrolysetiegel gegeben und das Lösungsmittel vor der Messung erneut abgedampft. In Abbildung 39 sind exemplarisch die Pyrogramme für die Fraktionen der Probe PLA-PEG4 dargestellt, wobei die von PLA stammenden Peaks (Massenspur  $m/z = 56$ ) rosa dargestellt sind, während die den PEG zugeordneten Signale der Massenspur  $m/z = 59$  blau wiedergegeben sind. Bei den Pyrogrammen der 1. und 2. Fraktion wurden die Peaks des PEG aufgrund ihrer geringen Intensitäten 10-fach vergrößert.

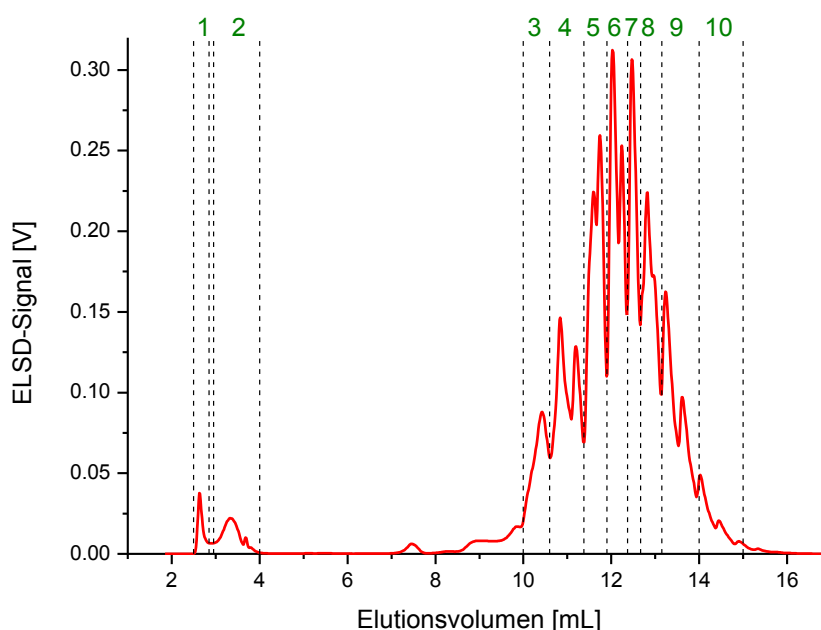
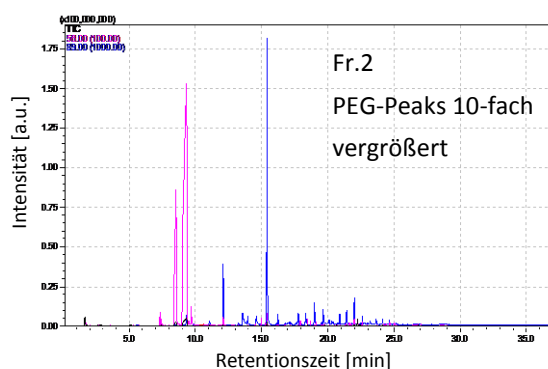
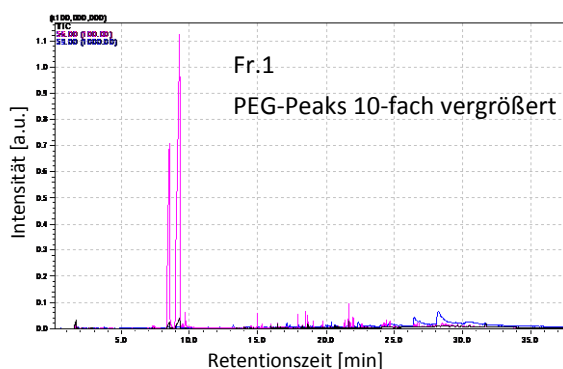


Abbildung 38: Fraktionierung der Probe PLA-PEG4 zur Py-GC-MS-Untersuchung. Messbedingungen gleich wie in Abbildung 34.



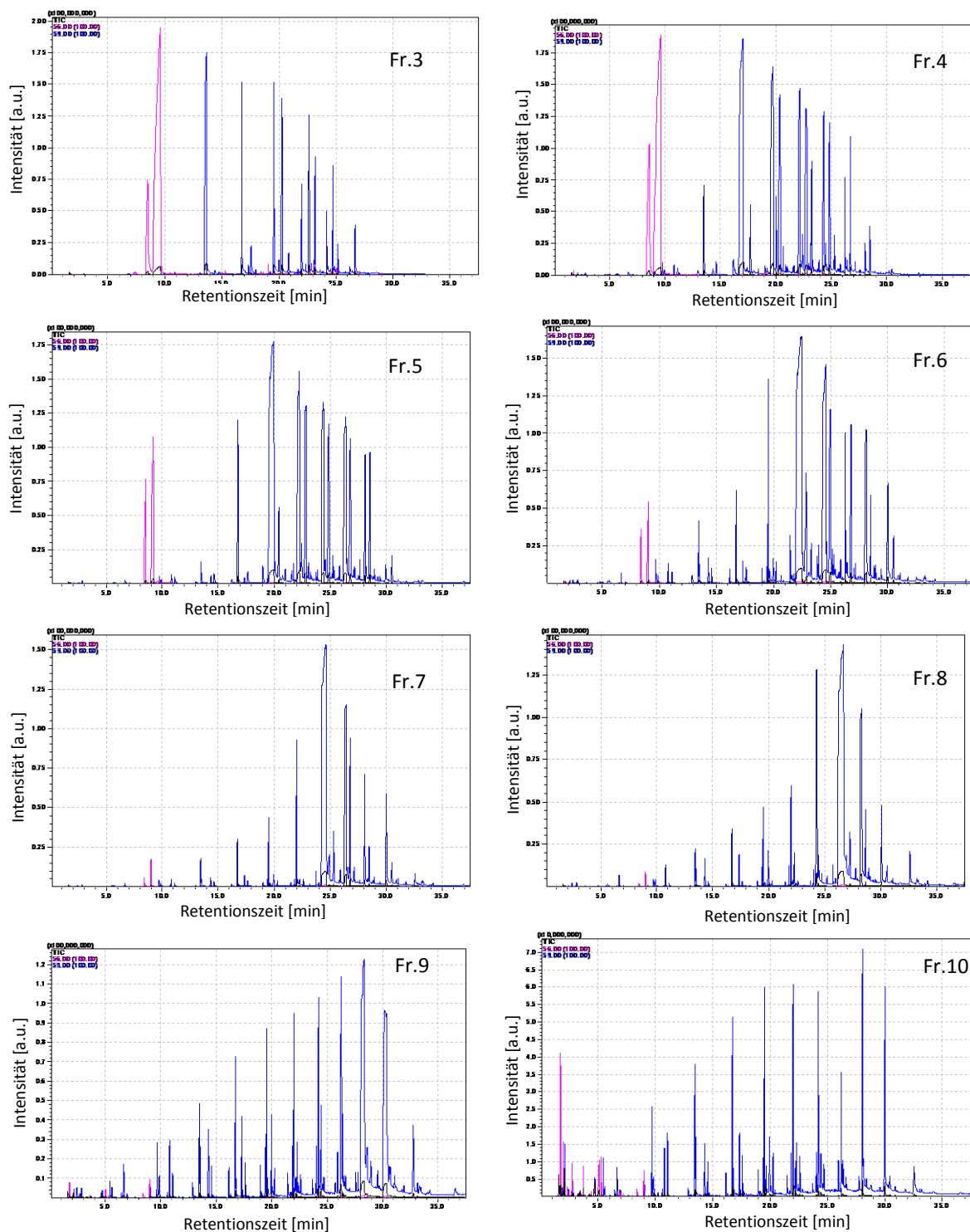


Abbildung 39: Pyrogramme der HPLC-Fractionen der Probe PLA-PEG4. PLA-Peaks mit der Massenspur  $m/z = 56$  sind in rosa dargestellt. PEG-Peaks mit der Massenspur  $m/z = 59$  werden blau dargestellt. Im Pyrogramm der Fraktion 1 und Fraktion 2 sind die Intensitäten der PEG-Peaks 10-fach vergrößert.



Wie man erkennen kann, findet man in jeder Fraktion sowohl die beiden Peaks für PLA bei 8.5 min und 9.0 min, als auch Peaks für PEG zwischen 13 min bis 28 min. Somit enthalten die 1. und 2. Fraktion nicht nur reines PLA sondern auch geringe Mengen an PEG. Unter Verwendung der Kalibrierkurve in Abbildung 37 können die PLA- und PEG-Gehalte in den Fraktionen berechnet werden. Die so erhaltenen Zusammensetzungen sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Zur übersichtigeren Darstellung werden in Abbildung 40 die PEG-Anteile in den Fraktionen gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Obwohl die Werte wegen der großen Fehlerschwankung der Kalibration nicht sehr genau sind, kann man eine Zunahme des PEG-Anteils mit steigendem Elutionsvolumen in der HPLC beobachten, wobei die ersten beiden Fraktionen nur geringe PEG-Anteile aufweisen. Die späteren Fraktionen besitzen erwartungsgemäß PEG-Anteile von über 50 %. Ab der 7. Fraktion liegt nahezu reines PEG vor. Dies entspricht der Erwartung, da PEG in der HPLC stärker adsorbiert wird als PLA und dessen Anteil somit mit steigendem Elutionsvolumen zunehmen sollte.

Tabelle 11: Peakflächen- und Massenanteile an PEG in den Py-GC-MS-Chromatogrammen der 10 HPLC-Fraktionen von PLA-PEG4.

Fraktion	$A_{\text{PEG}} / (A_{\text{PLA}} + A_{\text{PEG}})$	PEG-Anteil [%]
1	0.0348	3.5
2	0.0483	4.9
3	0.5267	53.4
4	0.7272	73.8
5	0.9668	98.4
6	0.9723	98.9
7	0.9902	100.8
8	0.9953	101.3
9	0.9962	101.4
10	0.9898	100.7

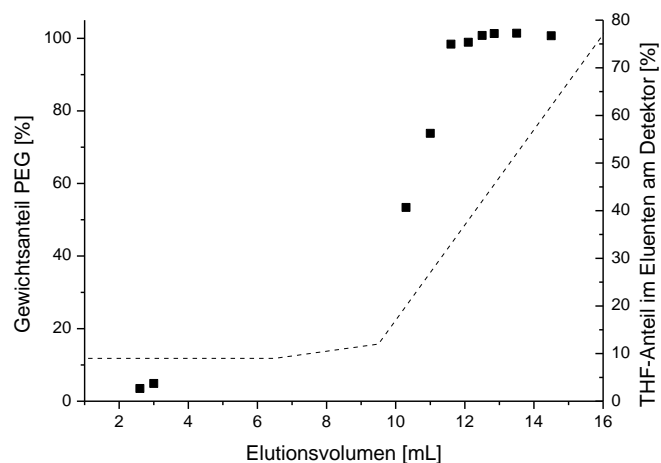


Abbildung 40: Gewichtsanteile des PEG in den Fraktionen aufgetragen gegen das Elutionsvolumen aus Abbildung 38. Die gestrichelte Linie gibt den THF Anteil am Detektor wieder.

Mittels der Py-GC-MS-Messungen konnte somit nachgewiesen werden, dass die Fraktion 1 und 2 nicht nur auf reines PLA mit der Endgruppe zurückzuführen sind, sondern in den beiden Fraktionen geringe Mengen an PEG enthalten ist. Dies deutet darauf hin, dass das reine PLA zusammen mit PLA-PEG-Copolymeren coeluiert. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass PEG350 PEG-Oligomere mit sehr geringer Molmasse enthält, deren Adsorptionskraft zu gering ist, um die bei der Abbaureaktion gebildeten Copolymere hinreichend zu adsorbieren.

#### **MALDI-TOF-MS hochmolekularer Proben nach partiellem Abbau mit Polyethylenglykol - monomethylether 2000**

Wie oben beschrieben, konnte das reine PLA mit der interessierenden Endgruppe EG<sub>1</sub> nach dem Abbau mit PEG350 nicht sauber von den PLA-PEG-Copolymeren abgetrennt werden, da die Adsorptionsstärke von PEG350 nicht ausreicht, um eine vollständige Trennung der reinen PLAs von den PEG-tragenden Strukturen zu erreichen. Daher wurde ein PEG-Monomethylether mit einem höheren mittleren Molekulargewicht von ca. 2000 g/mol eingesetzt, um eine bessere Trennung zwischen reinem PLA und dem Copolymer zu erzielen. Analog zum Abbau mit PEG350 wurde die Reaktion mit PEG2000 zunächst bei unterschiedlichen Mengenverhältnisse von PLA und PEG durchgeführt (s. Kap. 6.3.3), um die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Wegen des höheren Molekulargewichtes des PEG2000 im Vergleich zu PEG350 ist die molare Konzentration der OH-Endgruppe, die mit

dem PLA reagiert, bei gleicher PEG-Massenkonzentration viel niedriger. Daher wurde PEG2000 in höherer Konzentration eingesetzt. Dies führt zu einer erhöhten Viskosität der Reaktionslösung, wodurch die Reaktion verlangsamt werden könnte. Daher wurden die Mischungen nicht mehr bei Raumtemperatur, sondern bei 60°C auf dem Thermomixer über Nacht zur Reaktion gebracht. Nach der Reaktion wurden die Proben auf eine theoretische PLA-Konzentration von 2 g/L verdünnt und mittels SEC untersucht, um die Molekulargewichte und damit das Ausmaß des Abbaus zu ermitteln. In Abbildung 41 sind die SEC-Chromatogramme von PLA1, PEG2000 und der abgebauten Proben überlagert (links: komplettes Elugramm, rechts: Ausschnittsvergrößerung im Elutionsbereich von 9.5 - 14 mL).

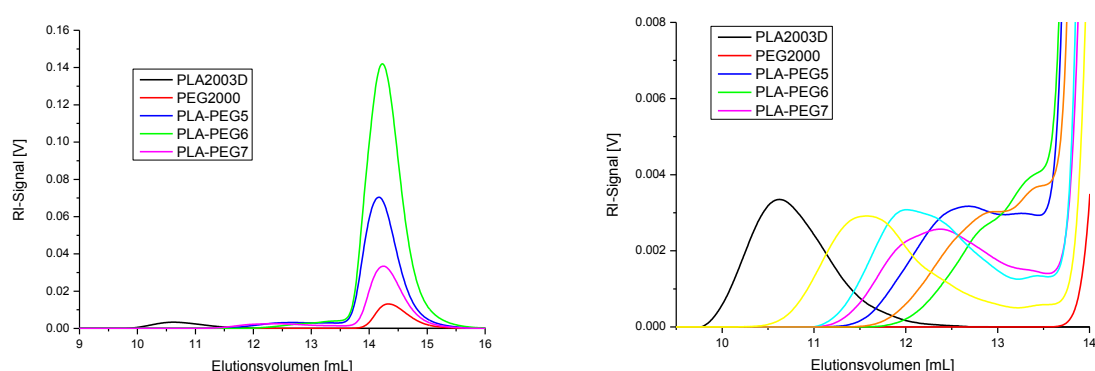


Abbildung 41: Überlagerung der SEC-Chromatogramme von PLA1, PEG2000 und der abgebauten Proben PLA-PEG5-7. Rechtes Bild: Ausschnittsvergrößerung im Elutionsbereich von 9.5-14 mL. (Die Messungen wurden in THF als Eluent mit der SEC-Konfiguration für niedermolekulare Proben im Kap.6.7.1 gemessen.)

Wie man erkennt, zeigt jede abgebaute Probe einen Peak niedriger und einen Peak viel größerer Intensität bei höherem Elutionsvolumen, wo auch reines PEG2000 eluiert. Wahrscheinlich ist der Peak bei hohem Elutionsvolumen auf überschüssiges PEG2000 zurückzuführen, während der Peak beim kleineren Elutionsvolumen zu den Abbauprodukten, nämlich den PLA-PEG-Copolymeren und dem reinen PLA mit der Endgruppe EG<sub>1</sub> korrespondiert. Wegen Überlappung der beiden Peaks ist es nicht möglich, die genaue Molekulargewichtsverteilung der Abbauprodukte zu bestimmen. Dennoch erkennt man, dass im Vergleich zum Peak der Ausgangsprobe PLA1 die Peaks der Abbauprodukte deutlich zu höheren Elutionsvolumen und damit zu niedrigeren Molmassen verschoben sind, was auf einen erfolgreichen Abbau hinweist.

Nach dem Abbau wurden die Proben mittels HPLC untersucht, um das reine PLA mit der Endgruppe EG<sub>1</sub> aus den PEG-haltigen Komponenten zu trennen. Ähnlich wie beim Abbau mit PEG350 wurden die Proben auf einer Kieselgel-Phase in einem Gradienten von CHCl<sub>3</sub> nach

THF gemessen. Da PEG2000 wegen des höheren Molekulargewichtes noch stärker als PEG350 auf der stationären Phase adsorbiert wird, wurde die Säule nach Erreichen von reinem THF noch mit einem stärker polaren Lösungsmittel, Methanol, gespült, um alle Substanzen aus der Säule zu eluieren. Die erhaltenen Elugramme sind in Abbildung 42 dargestellt. (links: ganzes Elugramm, rechts: Ausschnittsvergrößerung im Elutionsbereich von 5 – 5.5 mL)

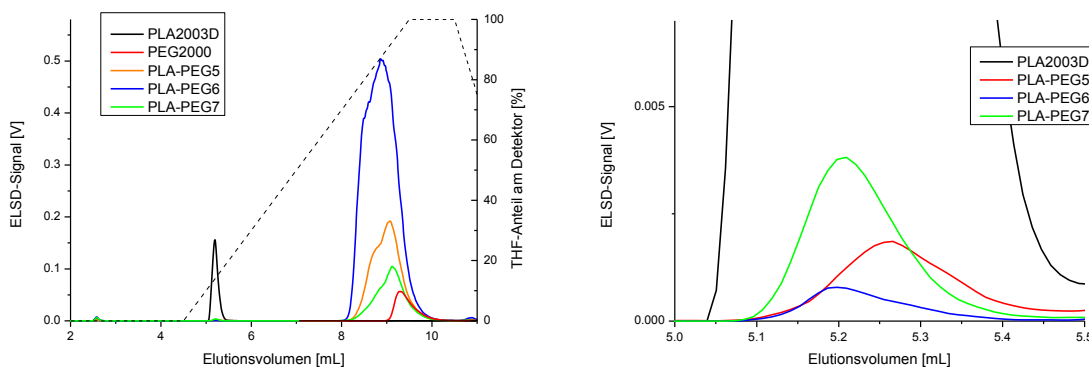


Abbildung 42: Elugramme für PLA1, PEG2000 und die abgebauten Proben in einem Gradienten von  $\text{CHCl}_3$  nach THF auf Nucleosil-Säule (1000Å, 7 $\mu$ ) (Proben in  $\text{CHCl}_3$  gelöst; Injektionsvolumen = 50  $\mu\text{L}$ ; T = 35 °C; Flussrate = 1 mL/min; Mobile Phase: 0-1 mL  $\text{CHCl}_3/\text{THF}/\text{MeOH}$  = 100/0/0; 6-7 mL  $\text{CHCl}_3/\text{THF}/\text{MeOH}$  = 0/100/0; 8 mL  $\text{CHCl}_3/\text{THF}/\text{MeOH}$  = 0/50/50; 8.01 mL  $\text{CHCl}_3/\text{THF}/\text{MeOH}$  = 100/0/0; 17 mL nächste Injektion). Die schwarze gestrichelte Linie gibt den THF-Anteil im Eluenten am Detektor an, der nach Gleichung 25 auf Seite 119 berechnet wurde. (rechtes Bild: Ausschnittsvergrößerung im Elutionsbereich von 5 – 5.5 mL)

Aus der Abbildung 42 lassen sich folgende Erkenntnisse gewinnen:

- Jede abgebaute Probe zeigt drei Peaks: einen Peak geringer Intensität bei 2.8 mL in 100%  $\text{CHCl}_3$ , einen Peak kleiner Intensität bei ca. 5.2 mL und einen Peak großer Intensität bei 8-10 mL.
- Da es durch die vorherigen Messungen bekannt ist, dass Polylactid und PEG beides in 100 %  $\text{CHCl}_3$  adsorbiert werden und erst bei höheren THF-Anteilen eluieren, stammt der Peak bei 2.8 mL nicht vom PLA oder PEG. Vermutlich ist der Peak auf Verunreinigungen, Salz von NaOH oder Nebenprodukten der Reaktion zurückzuführen.
- Der Peak bei ca. 5.2 mL korrespondiert vermutlich zu reinem PLA, da die Ausgangsprobe PLA1 beim gleichen Elutionsvolumen eluiert.

- Der Peak bei 8-10 mL liegt bei ähnlichen Elutionsvolumen wie der Peak des reinen PEG2000, ist jedoch teilweise zu kleineren Elutionsvolumen verschoben. Dieser Peak korrespondiert daher wahrscheinlich zu den im Abbau gebildeten PLA-PEG-Copolymeren und dem überschüssigen PEG2000.
- Im Vergleich zu den mit PEG350 abgebauten Proben (siehe Abbildung 34), bei welchen die Peaks des reinen PLA und der Copolymere nicht sauber voneinander getrennt waren, sind für den Abbau mit PEG 2000 die Peaks bei 5.2 mL und 8-10 mL weit voneinander getrennt. Dadurch sollte eine saubere Abtrennung des reinen PLAs mit der Endgruppe aus den PEG-haltigen Komponenten möglich sein.

Wie oben beschrieben, stammt der Peak bei 5.2 mL vermutlich vom reinen PLA mit der zu bestimmenden Endgruppe EG1. Um dies zu prüfen, wurde der Peak bei 5.2 mL der Probe PLA-PEG7 dreifach fraktioniert und mittels Py-GC-MS untersucht. Das erhaltene Pyrogramm wird in Abbildung 43 dargestellt.

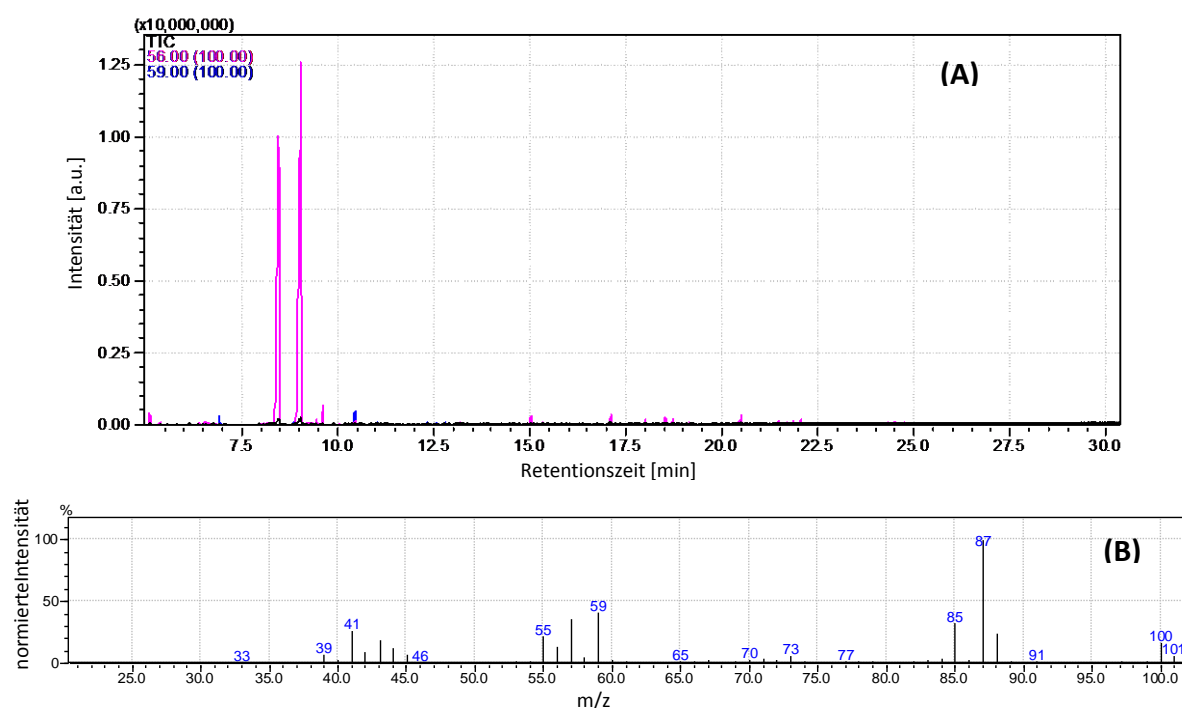


Abbildung 43: **A:** Pyrogramm der HPLC-Fraktion für den Peak bei 5.2 mL der Probe PLA-PEG7. Peaks mit der Massenspur  $m/z = 56$  sind in rosa dargestellt. Peaks mit der Massenspur  $m/z = 59$  werden blau dargestellt. **B:** Massenspektrum des Peaks bei 10.5 mL.

Im Pyrogramm beobachtet man die beiden PLA-Peaks bei 8.5 min und 9.0 min. Außerdem erkennt man noch einige Peaks sehr geringer Intensitäten, dessen Massenspektren die für PEG charakteristische Massenspur  $m/z = 59$  zeigen. Vergleicht man die Massenspektren

---

dieser Peaks, wie z.B. das des Peaks bei 10.5 mL (s. Abbildung 43B), mit den Massenspektren von PEG (s. Abbildung 36), kann festgestellt werden, dass sie sich deutlich unterscheiden. Somit stammen diese Peaks nicht von PEG, sondern von unbekannten Verunreinigungen wahrscheinlich aus den verwendeten Lösungsmitteln. Diese reichern sich durch das Abdampfen an.

Da im Pyrogramm der HPLC-Fraktion keine PEG-Peaks identifiziert werden konnten, ist entweder kein PEG enthalten, oder der PEG-Gehalt liegt unter der Nachweisgrenze der Py-GC-MS. Deshalb liegt in dieser Fraktion nur oder vorwiegend reines PLA mit der Endgruppe EG<sub>1</sub> vor. Um die Endgruppe EG<sub>1</sub> zu identifizieren wurde die Fraktion mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Hierzu musste der Peak bei 5.2 mL erneut von den PEG-haltigen Anteilen getrennt werden. Aufgrund der geringen injizierten Probemengen und der geringen Peakintensität wären hierfür bei der Fraktionierung mittels HPLC sehr lange Zeiten und erhebliche Mengen an Lösungsmitteln notwendig.

Eine Alternative zur HPLC-Fraktionierung bietet jedoch die Festphasenextraktion. Wie im Kap. 4.6 beschrieben, besitzt die Festphasenextraktion die Vorteile der geringen Kosten, große Zeitersparnis, geringen Verbrauch an Lösungsmitteln und hohe Anreicherungsfaktoren. Der Nachteil der SPE gegenüber HPLC liegt in der geringeren Auflösung. Da jedoch im vorliegenden Fall eine gute Auflösung in der HPLC erreicht war, sollte der Trenneffekt in diesem Fall ausreichend sein, um auch mittels SPE eine saubere Fraktionierung zu erzielen, da das reine PLA schon bei einem THF-Anteil von ca. 12% eluiert, während die PEG-PLA-Copolymeren und PEG einen THF-Anteil von ca. 80% zur Elution benötigen.

Die verwendete SPE-Kartusche war wie die HPLC-Säule mit Kieselgel als stationärer Phase gefüllt. Daher sollten sowohl PLA als auch PEG in CHCl<sub>3</sub> adsorbiert werden. PLA sollte dann durch einen geringeren Anteil an THF desorbiert werden, während die PEG-haltigen Bestandteile erst bei höheren THF-Anteilen eluieren sollten. Um dies zu überprüfen und um festzustellen, bei welcher Eluentenzusammensetzung reines PLA eluiert, während PLA-PEG-Copolymeren und PEG adsorbiert sind, wurde versucht, eine Mischung aus PLA und PEG2000 mittels SPE zu trennen. Hierzu wurden mit Rücksicht auf die Beladungsgrenzen der SPE-Kartusche (siehe Kap. 6.3.4) und das Mengenverhältnis von PLA und PEG beim Abbau 4 mg PLA und 20 mg PEG2000 in CHCl<sub>3</sub> aufgelöst und auf die Kartusche gegeben. Anschließend wurden durch Spülen der Kartusche mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Anteile an THF Fraktionen erhalten. Die Fraktionen bei unterschiedlichen Lösungsmittelzusammensetzungen wurden gesammelt, abgedampft, erneut in CHCl<sub>3</sub> aufgenommen und dann in HPLC mit dem oben verwendeten Gradienten vermessen. Ziel war es zu prüfen, in

welchen SPE-Fractionen PLA oder PEG enthalten sind. Die Elugramme werden in Abbildung 44 dargestellt.

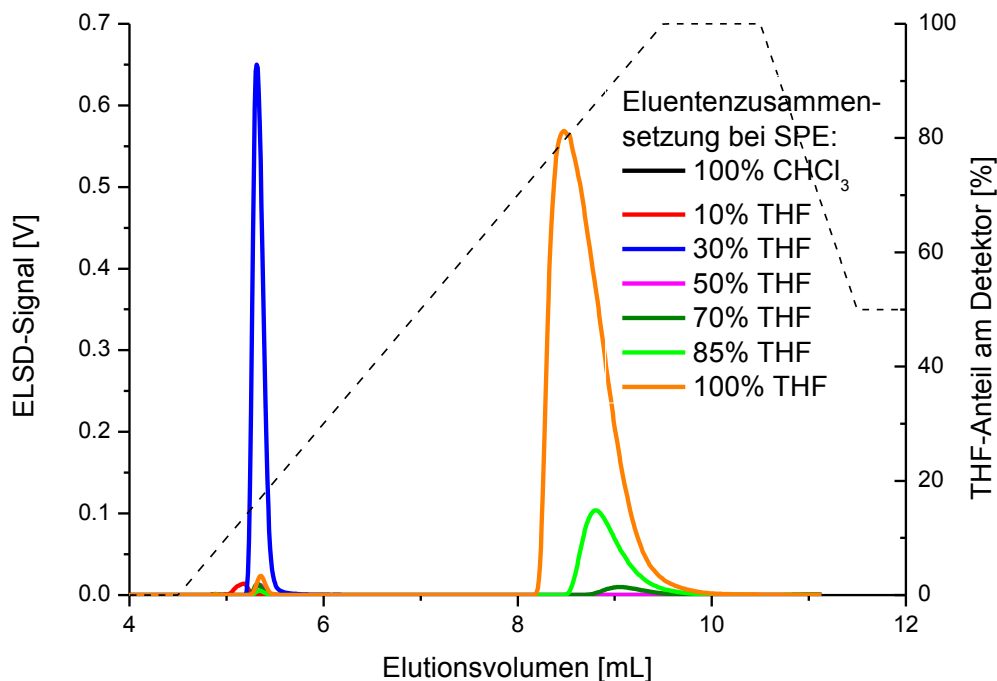


Abbildung 44: Elugramme der SPE-Fractionen von 4 mg PLA1 und 20 mg PEG2000 erhalten für unterschiedliche Zusammensetzungen an THF in  $\text{CHCl}_3$  in der SPE. (Jede Fraktion wurde abgedampft und mit 1 mL  $\text{CHCl}_3$  wieder aufgelöst. Säule: Nucleosil 1000 Å, 7 $\mu$ ; Injektionsvolumen = 50  $\mu$ L; T = 35 °C; Flussrate = 1 mL/min; Mobile Phase: 0-1 mL  $\text{CHCl}_3$ /THF/MeOH = 100/0/0; 6-7 mL  $\text{CHCl}_3$ /THF/MeOH = 0/100/0 ; 8 mL  $\text{CHCl}_3$ /THF/MeOH = 0/50/50; 8.01 mL  $\text{CHCl}_3$ /THF/MeOH = 100/0/0; 17 mL nächste Injektion). Die schwarze gestrichelte Linie gibt den THF-Anteil im Eluenten am Detektor an.

In der Fraktion bei 100 %  $\text{CHCl}_3$  ist kein Peak zu erkennen. Wie erwartet werden offenbar sowohl PLA als auch PEG in der SPE-Kartusche adsorbiert. Bei 10 % THF zeigt sich bei 5.2 mL also beim Elutionsvolumen des PLA ein Peak geringer Intensität, während in der Fraktion bei 30 % THF ein intensiver Peak auftritt. Dies weist darauf hin, dass ein kleiner Teil des PLA1 bei 10 % THF, und der größte Teil bei 30 % THF eluiert. Bei 50 % THF zeigt sich kein Peak für PLA. Das PLA sollte daher schon vollständig aus der SPE-Kartusche eluiert sein, während PEG noch adsorbiert ist. Die Eluate bei 70 %, 85 % und 100 % THF weisen alle einen Peak bei Elutionsvolumen zwischen 8 und 10 mL auf, dessen Intensität mit steigendem THF-Anteil zunimmt. Daraus lässt sich schließen, dass PEG2000 erst ab 70 % THF desorbiert wird.

Nachdem die Eluentenzusammensetzungen zur Elution vom PLA und PEG ermittelt waren, konnten nun die angebauten Proben mittels SPE fraktioniert werden. Der Fraktionierungsvorgang wird in Abbildung 45 schematisch dargestellt.

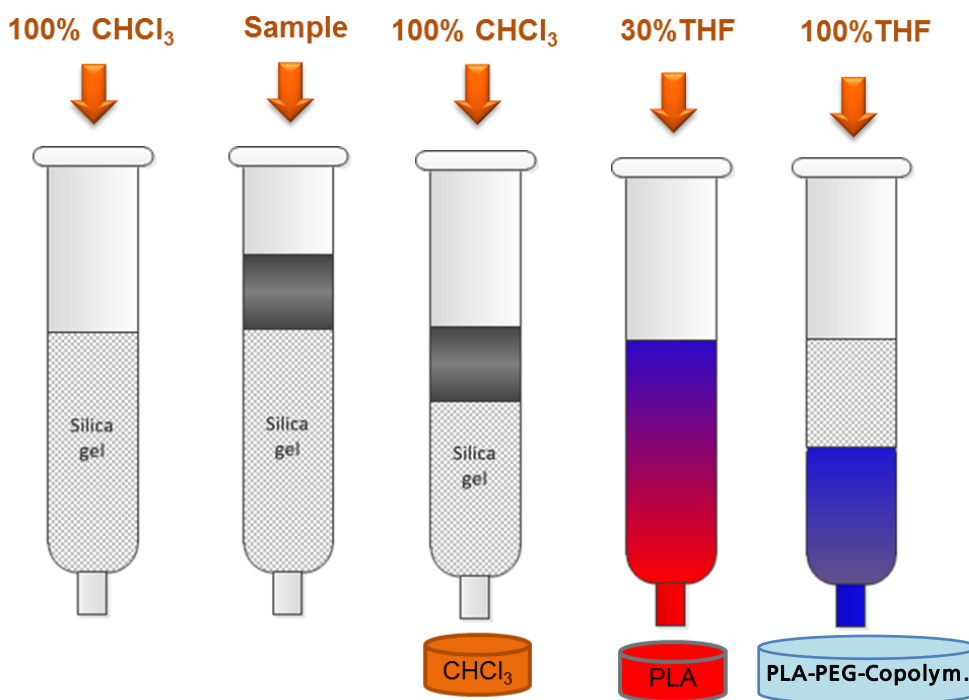


Abbildung 45: Schematische Darstellung der SPE-Fraktionierung der angebauten PLA-Proben.

Zunächst wird die SPE-Kartusche mit CHCl<sub>3</sub> befeuchtet und konditioniert, anschließend wird die abgebaute Probe, die theoretisch 4 mg PLA und 20 mg PEG enthält, abgedampft, in 1 mL CHCl<sub>3</sub> wieder gelöst und auf die Kartusche gegeben. Alle Substanzen wie PLA, PEG und PLA-PEG-Copolymere sollten in der Kieselgel-Phase adsorbiert werden. Die Kartusche wird noch mal mit ca. 6 mL CHCl<sub>3</sub> gewaschen, um eventuelle Verunreinigungen und Nebenprodukte der Probenlösung zu entfernen. Diese so erhaltene Fraktion in reinem CHCl<sub>3</sub> wird im Folgenden als SPE-Fraktion 1 bezeichnet. Anschließend wird das reine PLA durch 6 mL einer CHCl<sub>3</sub>/THF-Mischung (70/30 v/v) von der SPE-Kartusche eluiert und diese Fraktion als SPE-Fraktion 2 bezeichnet. Schließlich werden die PEG-haltigen Bestandteile mit 100% THF von der Kartusche gespült und in der SPE-Fraktion 3 gesammelt.

Nach dem oben beschriebenen Verfahren wurde eine durch den Abbau von PLA1 erzeugte Probe (PLA-PEG7) fraktioniert. Vor der anschließenden MALDI-TOF-MS-Untersuchung der Fraktionen wurde zunächst der Erfolg der SPE-Aufreinigung unter Verwendung des oben



entwickelten Gradienten mittels HPLC überprüft. In Abbildung 46 sind die Elugramme der abgebauten Probe vor der SPE-Fraktionierung und der drei SPE-Fractionen überlagert.

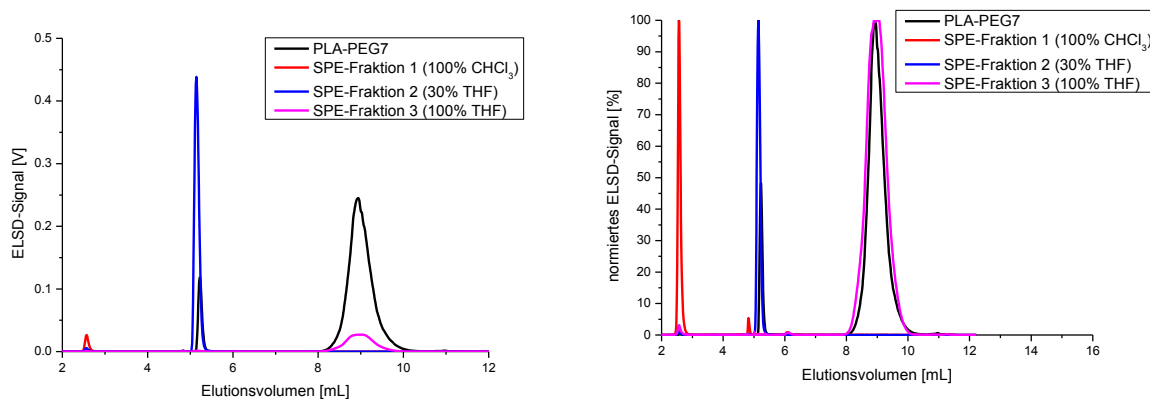


Abbildung 46: Elugramme des abgebauten PLA1 (PLA-PEG7) und derer SPE-Fractionen in einem Gradienten von CHCl<sub>3</sub> nach THF. Messbedingungen wie in Abbildung 44. (links: Elugramme ohne Normierung; rechts: normierte Elugramme)

Wie man erkennt, zeigt die abgebaute Probe vor der SPE-Fraktionierung zwei Peaks bei 5.2 mL und 9 mL, welche dem reinen PLA und den PEO-haltigen Strukturen zuzuordnen sind. Die erste SPE-Fraktion zeigt erwartungsgemäß weder einen Peak beim Elutionsvolumen des PLA noch bei dem des PEG, sondern lediglich einen Peak geringer Intensität bei 2.8 mL, der wahrscheinlich auf Verunreinigungen zurückzuführen ist. In der SPE-Fraktion 2 wird nur ein Peak bei 5.2 mL beobachtet, während die SPE-Fraktion 3 nur den Peak bei 9 mL aufweist. Dies bedeutet, dass in Fraktion 2 reines PLA vorliegt, während in Fraktion 3 PLA-PEG-Copolymer oder PEG enthalten sind. Aus den Elugrammen lässt sich damit schließen, dass durch die SPE-Fraktionierung das reine abgebaute PLA mit der interessierenden Endgruppe erfolgreich von den anderen Abbauprodukten abgetrennt wird.

Zur Identifizierung der Endgruppe wurde die SPE-Fraktion 2 verdampft, mit 0.5 ml CHCl<sub>3</sub> wieder gelöst und mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Das Massenspektrum ist in Abbildung 47 wiedergegeben.

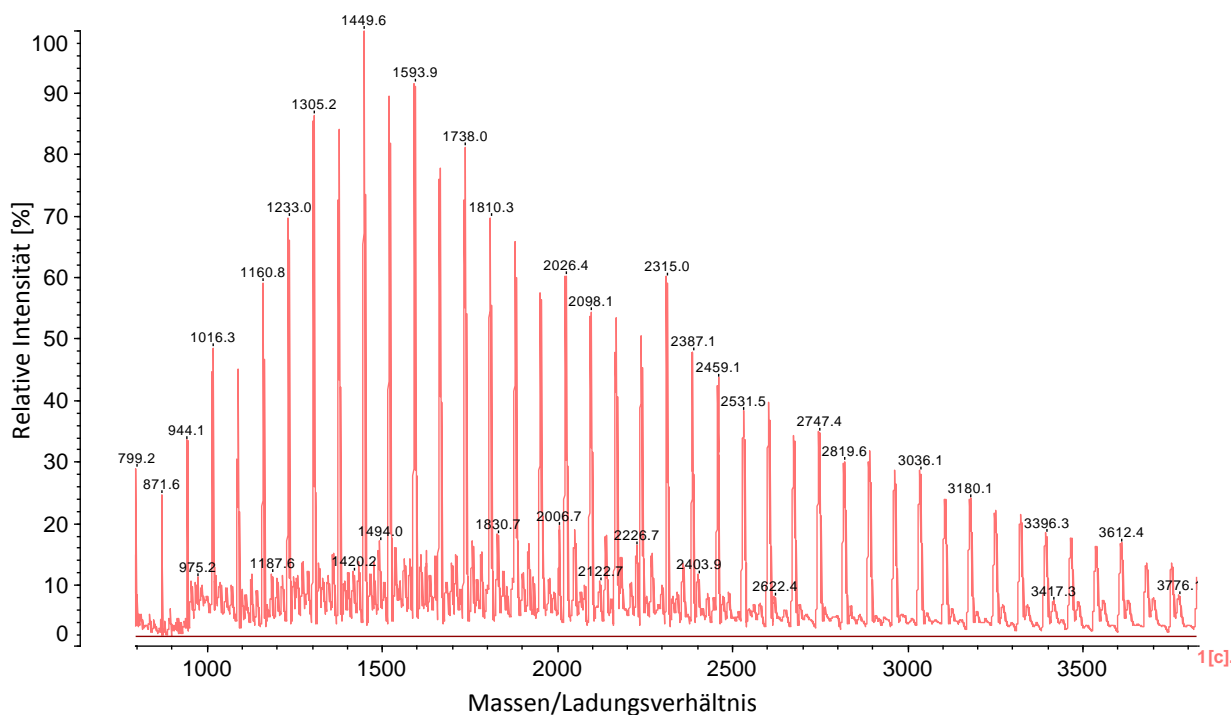


Abbildung 47: MALDI-Spektrum der SPE-Fraktion 2 der abgebauten Probe PLA1 (PLA-PEG7).

Im Spektrum wird eine Verteilung mit den Peakabständen 72 m/z beobachtet, welches somit einer PLA-Verteilung entspricht. Zur Endgruppenbestimmung wurde die Restmasse für die Endgruppen mit 1449.6 g/mol berechnet und mit den Molmassen möglicher Endgruppen in der Tabelle 9 verglichen. Ähnlich wie schon bei der Nebenverteilung der Probe PLA16 in Abbildung 25 ist die gefundene Restmasse von 1.4 g/mol vereinbar mit der Masse eines zyklischen PLA oder von PLA mit einer Butylester- oder Nonylester-Endgruppe am einen und einer Hydroxylgruppe am anderen Kettenende. Da alle diese drei Möglichkeiten nahezu dieselbe Restmasse liefern, können sie bei MALDI-TOF-MS nicht endgültig unterschieden werden.

Wie in Abbildung 26 gezeigt wurde, konnte die Probe PLA1, deren Endgruppen unbekannt sind, aufgrund der hohen Molmasse von 70 kDa nicht direkt mittels MALDI-TOF-MS untersucht werden. Nach dem partiellen Abbau unter Verwendung von PEG2000 und der anschließenden SPE-Fraktionierung konnte jedoch die Struktur auf Zyklen, oder OH-funktionalisierte PLAs mit Butylester- oder Nonylester-Endgruppe eingeschränkt werden. Da die Endgruppen der Probe jedoch unbekannt waren, sollte jedoch geprüft werden, ob sich durch den Ansatz des partiellen Abbaus tatsächlich die vorliegenden Funktionalitäten

identifizieren lassen. Um diese Frage zu beantworten, wurden Proben mit bekannten Endgruppen auf gleiche Weise behandelt.

Zunächst wird die Probe PLA9, welche mit 1-Dodecanol gestartet wurde, untersucht. Das MALDI-Spektrum der SPE-Fraktion 2 wird in Abbildung 48 gezeigt.

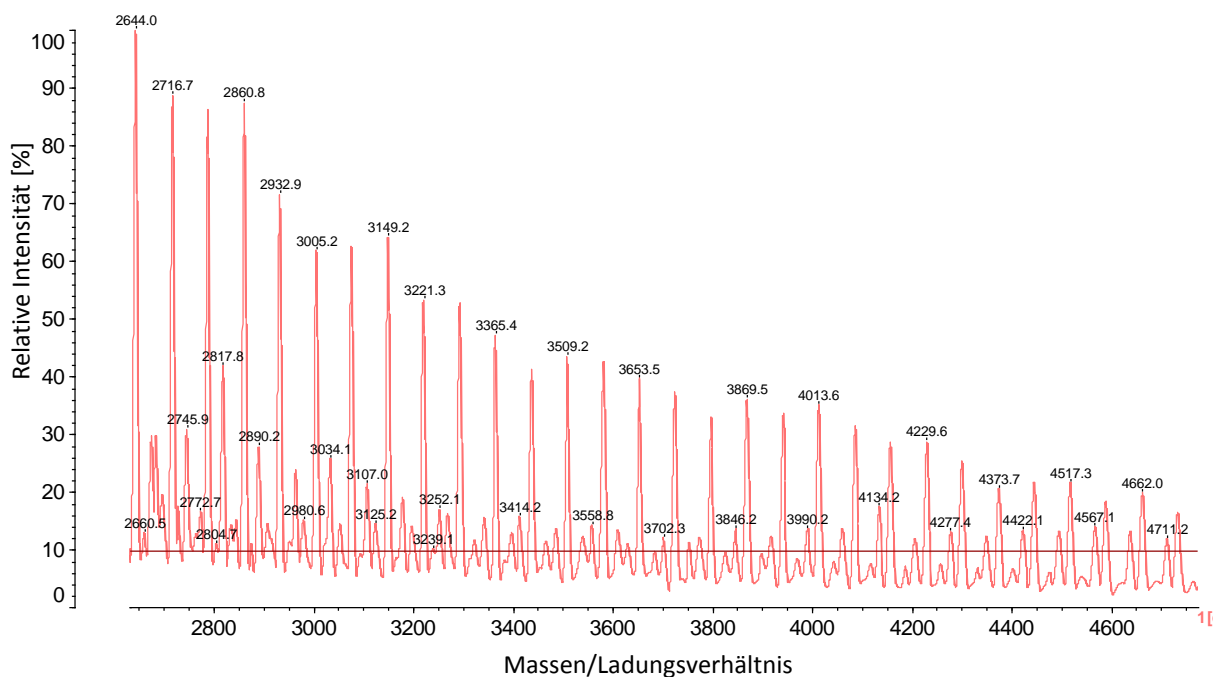


Abbildung 48: MALDI-Spektrum der SPE-Fraktion 2 der aus PLA9 (Dodecanol gestartet) abgebauten Probe.

Da die Probe nach der Synthese eine Dodecylester- und eine Alkohol-Endgruppe besitzen soll, sollte die SPE-Fraktion 2 der abgebauten Probe nach dem Reaktionsschema in

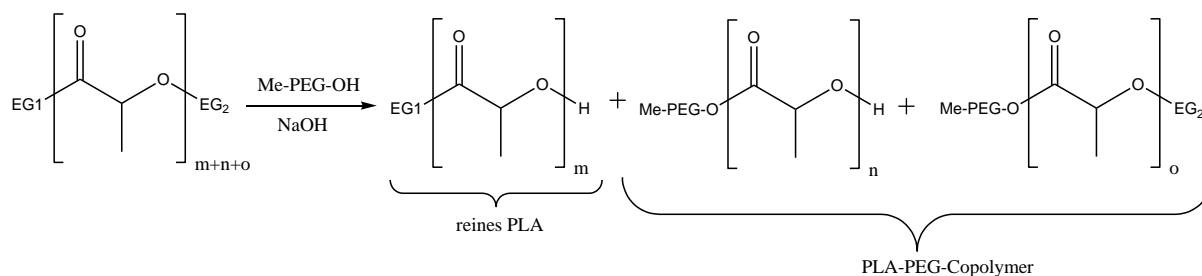


Abbildung 31 auch die gleichen Endgruppen haben. Im MALDI-Spektrum der SPE-Fraktion sieht man eine PLA-Verteilung mit Peakabständen von 72 m/z und einer Restmasse von 42.8 g/mol, was zur Struktur eines PLA mit Dodecylester- und OH-Endgruppe passt. Dies bedeutet, dass mit den entwickelten Verfahren des partiellen Abbaus tatsächlich die Originalendgruppe identifiziert werden kann. Neben der Hauptverteilung können noch

weitere Verteilungen geringer Intensitäten beobachtet werden, die vermutlich auf  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{K}^+$ -Addukte oder Fragmente zurückzuführen sind.

Als weiterer Beleg für die Eignung des entwickelten Verfahrens zur Identifizierung der Endgruppen in PLA wurde die Probe PLA7 untersucht, die eine Butylester- und eine Alkohol-Endgruppe aufweisen sollte. Diese Probe hat ein geringeres Molekulargewicht als PLA1 oder PLA9 und konnte daher auch ohne partiellen Abbau mittels MALDI-TOF-MS untersucht werden. In Abbildung 49 werden die Massenspektren der Originalprobe und der SPE-Fraktion 2 nach dem Abbau verglichen:

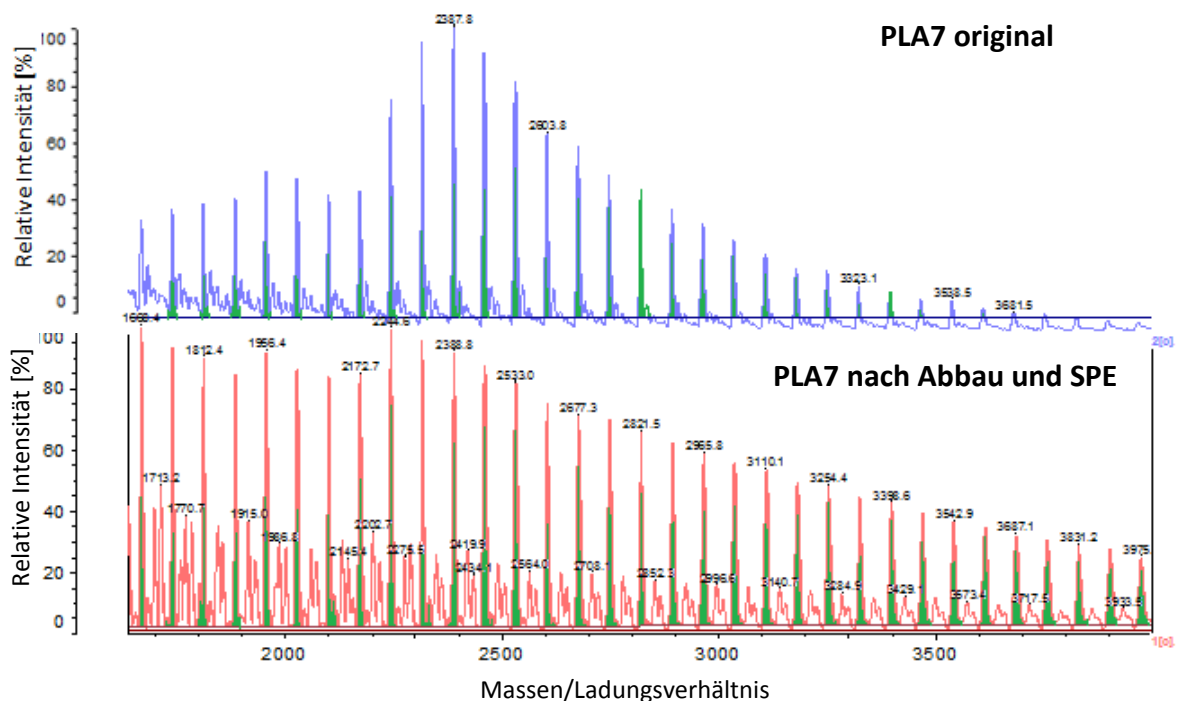


Abbildung 49: MALDI-Spektrum der mit Butanol gestarteten Probe PLA7 und der SPE-Fraktion 2 der davon abgebauten Probe.

In beiden MALDI-Spektren werden Verteilungen erkannt, die anhand der Peakabstände als PLA identifiziert werden. Für die intensivsten Verteilungen (grün markiert) finden sich Restmassen von 2.8 g/mol für die Originalprobe und 3.8 g/mol für die SPE-Fraktion. Unter Berücksichtigung der akzeptablen Abweichung können die Peakmolmassen beider Verteilungen als identisch betrachtet werden. Sie korrespondieren sehr gut mit der erwarteten Restmasse von 2.06 g/mol (Tabelle 9) für ein PLA mit Butylester- und Alkohol-Endgruppe. Im Vergleich zur Originalprobe hat die SPE-Fraktion eine unterschiedliche Intensitätsverteilung, was logisch ist, da durch den Abbau sich die

Molekulargewichtsverteilung verändert. Auf den ersten Blick erscheint es jedoch schwer verständlich, dass die abgebaute Probe sich zu höheren Molmassen erstreckt wie das Ausgangsmaterial. Der Grund dafür ist wahrscheinlich, dass bei der Originalprobe nur die niedermolekularen Anteile im MALDI-Spektrum beobachtet werden können, während die meisten Ketten wegen der hohen Molmassen gar nicht detektierbar sind. Dieses Beispiel belegt klar, dass die Originalendgruppe EG1, in diesem Fall Butylester, auch nach dem Abbau und der Separation mittels SPE im MALDI-Spektrum identifiziert werden.

Bei den beiden diskutierten Beispielen handelt es sich um PLAs, die Esterendgruppen tragen. Als Nächstes wurde es untersucht, ob auch in PLAs, welche eine Carbonsäure-Endgruppe tragen, die Endgruppe identifiziert werden kann. Hierzu wurde eine Probe, die nach Herstellerangaben Carbonsäureendgruppe besitzen sollte, wie oben abgebaut, aufgearbeitet und anschließend mittels MALDI-TOF-MS vermessen. Die MALDI-Spektren der Ausgangsprobe, die aufgrund der niedrigen Molmasse direkt der Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS zugänglich war, und der aufgearbeiteten Probe werden in Abbildung 50 gegenübergestellt:

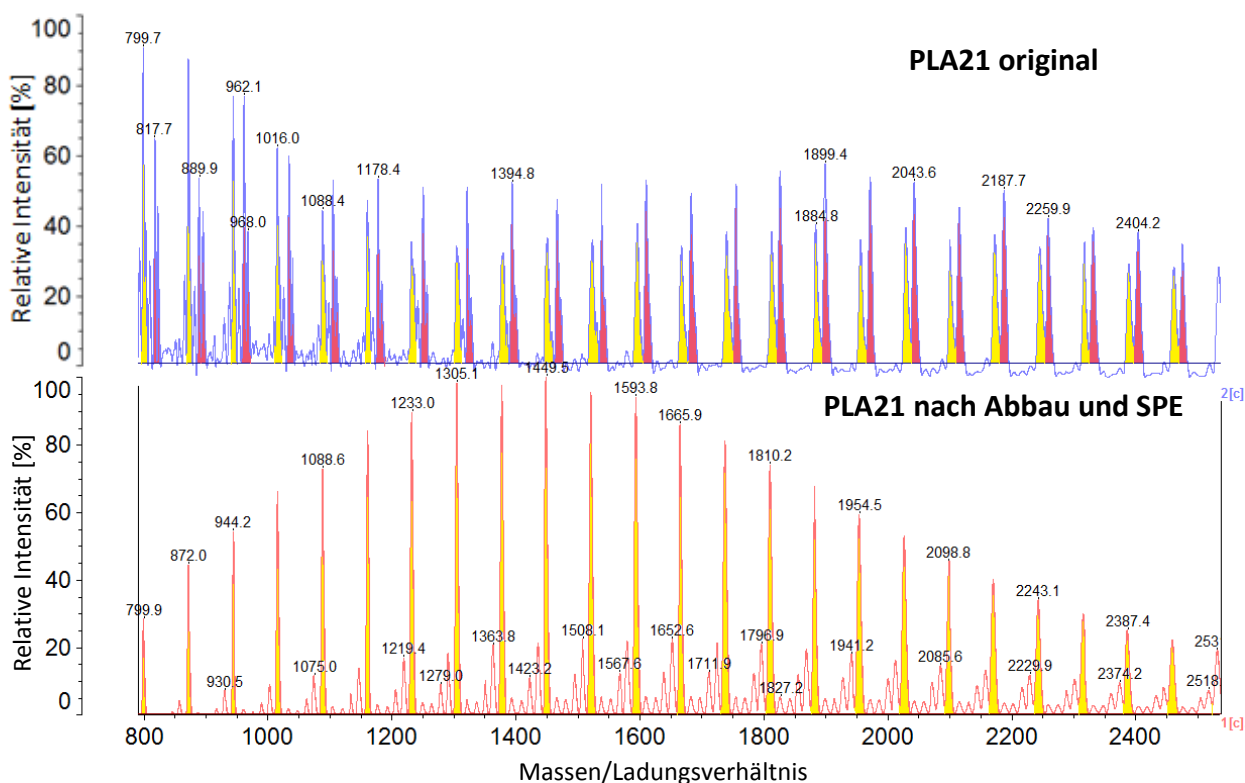


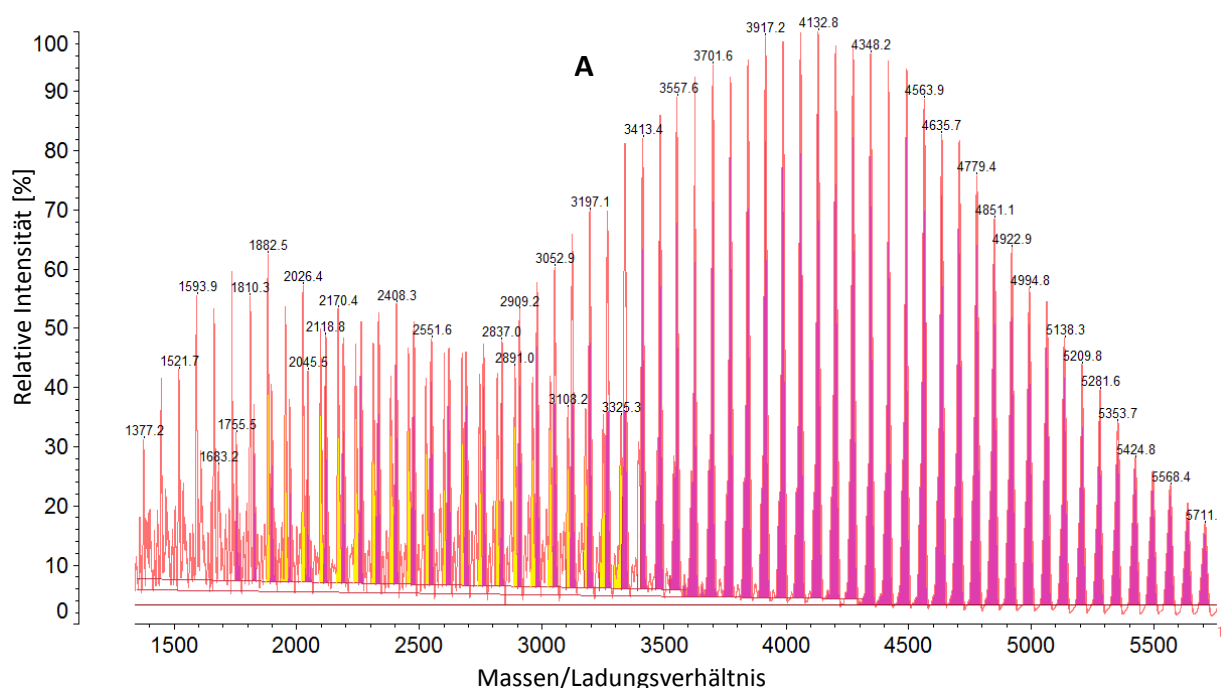
Abbildung 50: MALDI-Spektrum der Probe PLA21 und der SPE-Fraktion 2 der daraus abgebauten Probe.

Im MALDI-Spektrum der Ausgangsprobe werden zwei PLA-Verteilungen beobachtet. Werden die Restmassen für die beiden Serien berechnet, passt zu der rot markierten Verteilung die

Struktur eines PLA mit Carbonsäure- und Alkohol-Endgruppe, den vom Hersteller angegebenen Endgruppen. Die Restmasse der zweiten, gelb markierten Verteilung passt zur Restmasse von Zyklen, Butylester/OH oder Nonylester/OH-Endgruppe, wie auch schon die Nebenverteilung der Probe PLA16 (siehe Abbildung 25). Bei Probe PLA21 ist diese Verteilung mit hoher Wahrscheinlichkeit auf PLA-Zyklen zurückzuführen, da bei der Synthese der Probe kein Butanol oder Nonanol verwendet wurde. Wie bei PLA16 ist hier das zyklische PLA wahrscheinlich durch Backbiting-Reaktion entstanden.

Im Vergleich zur Ausgangsprobe erkennt man im MALDI-Spektrum der abgebauten und aufgereinigten Probe nur noch die gelb markierte Verteilung, für die zyklischen PLA-Ketten, aber keine Verteilung für die Carbonsäure-Endgruppe mehr. Die PLA-Zyklen können entweder noch aus der ursprünglichen Probe stammen, oder während der Umsetzung entstanden sein. Das unerwartete Verschwinden der Verteilung für Carbonsäure-Endgruppe ist ein Hinweis darauf, dass PLAs mit Säure-Endgruppe während der Abbaureaktion umgesetzt werden oder bei der SPE verlorengehen.

Um festzustellen, ob PLA mit Säure-Endgruppe während des Abbaus oder bei der anschließenden SPE-Fraktionierung verschwindet, wurden Lösungen aus PLA21 und PEG2000 mit vergleichbaren Konzentrationen und Mengenverhältnissen wie bei der Abbaureaktion hergestellt und ohne weiteren Abbau mittels SPE fraktioniert. Anschließend wurde die SPE-Fraktion 2 mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Das korrespondierende MALDI-Spektrum wird in Abbildung 51 gezeigt.



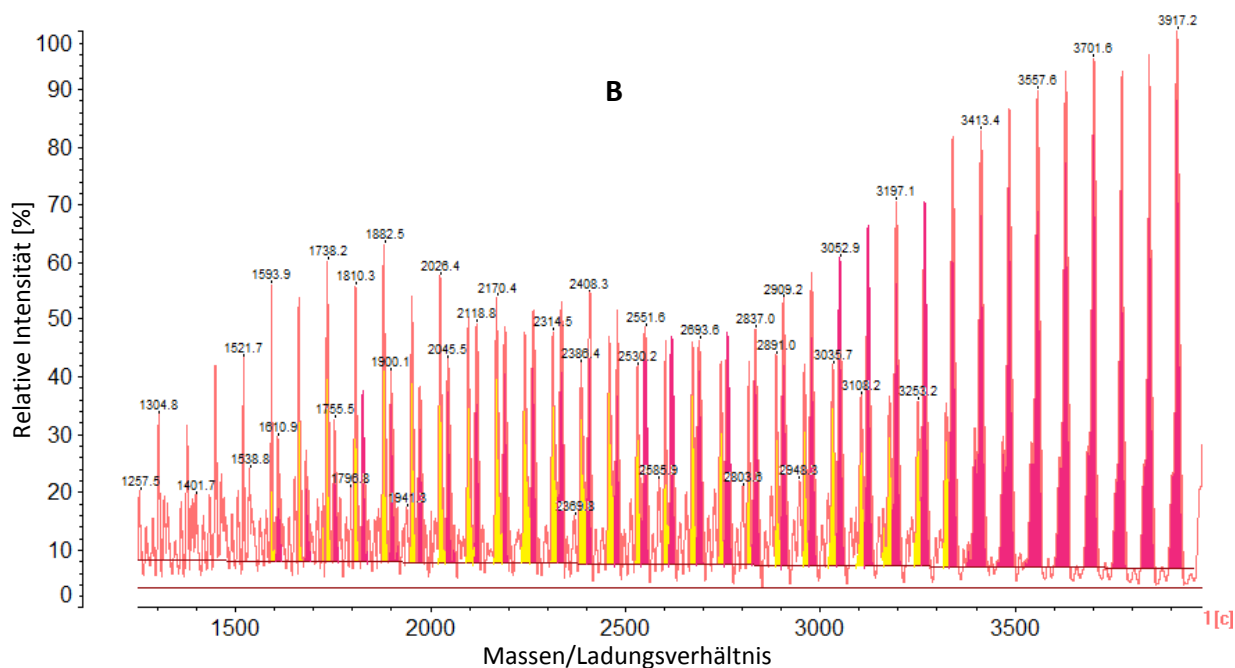


Abbildung 51: MALDI-Spektrum der SPE-Fraktion 2 der Mischung von PLA21 und PEG2000. (**A**: gesamtes Spektrum, **B**: Ausschnittvergrößerung im Bereich 1300 – 4000 m/z)

Im MALDI-Spektrum können zwei PLA-Verteilungen identifiziert werden, eine Verteilung größerer Intensität für PLA mit Säure-Endgruppe (rosa markiert), sowie eine Verteilung kleiner Intensität für zyklisches PLA (gelb markiert). Da die Ketten mit Säureendgruppen im MALDI wiedergefunden wurden, bedeutet dies, dass PLA mit Säure-Endgruppe nicht durch SPE-Fraktionierung verloren geht, sondern wahrscheinlich bei der Abbaureaktion umgesetzt wurde.

Eine Möglichkeit ist, dass bei der Abbaureaktion die Carbonsäure-Endgruppe durch NaOH zum Na-Salz umgesetzt wurde. Da das Salz eine höhere Polarität als die Carbonsäure-Gruppe hat, könnte es stärker mit der Kieselgelphase der SPE-Kartusche wechselwirken. Somit könnte es bei 30% THF noch in der SPE-Kartusche adsorbiert sein und erst bei höheren THF-Anteilen mit den PLA-PEG-Copolymeren und PEG zusammen eluieren. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde PLA21 noch einmal auf die gleiche Weise abgebaut, die Reaktionslösung jedoch nach dem Abbau mit einer äquivalenten Menge an Essigsäure angesäuert, um damit eventuell gebildetes Natriumsalz wieder zur Carbonsäure umzusetzen. Die so erhaltene Lösung wurde anschließend mittels SPE fraktioniert und die Fraktion bei 30 % THF mit MALDI-TOF-MS untersucht. Das erhaltene MALDI-Spektrum ist in Abbildung 52 gezeigt.

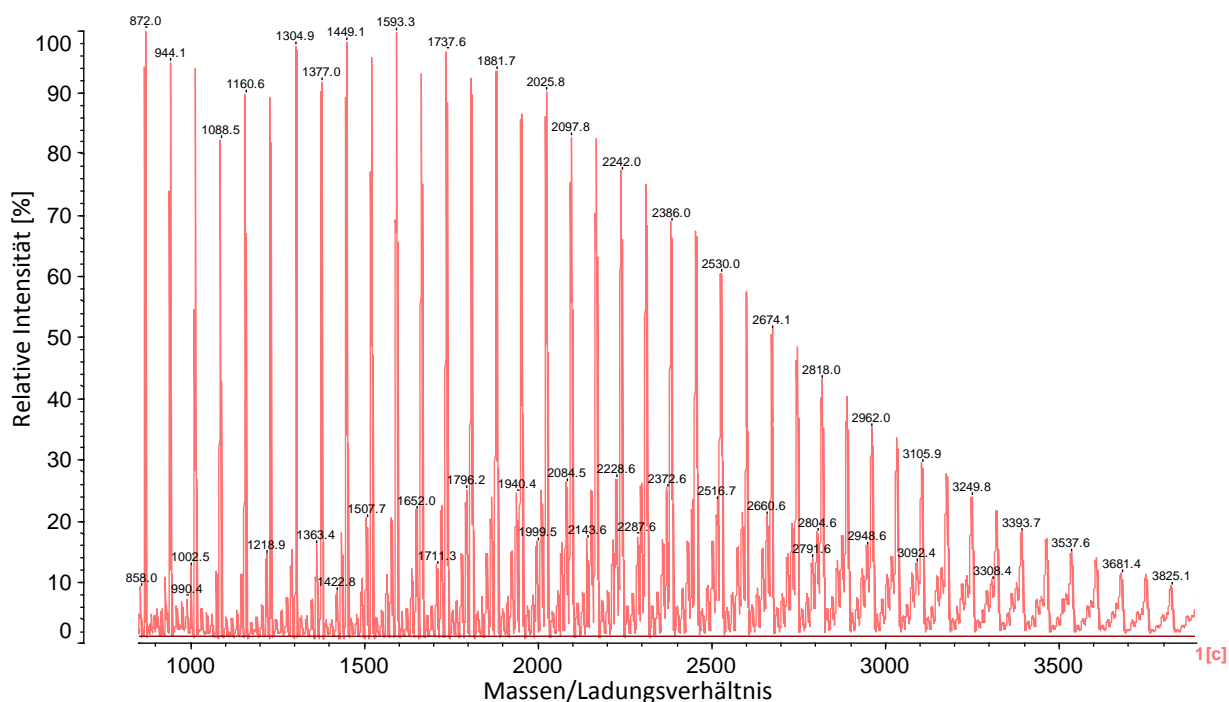


Abbildung 52: MALDI-Spektrum SPE-Fraktion 2 der aus PLA21 abgebauten Probe. Die Probe wurde vor der SPE-Fraktionierung mit Essigsäure angesäuert.

In Abbildung 52 kann erneut nur die Verteilung für PLA-Zyklen erkannt werden, während die erwartete Verteilung für die Säureendgruppe nicht gefunden wird. Somit scheint Salzbildung als Grund für das Verschwinden der PLA-Ketten mit Säureendgruppe ausgeschlossen.

Eine andere mögliche Erklärung für das Verschwinden der Säureendgruppe ist die Veresterung der Carbonsäureendgruppe durch PEG. In der Regel wird die Veresterung durch Säure katalysiert und eine basenkatalysierte Veresterung ist nicht möglich, da die Säure in das korrespondierende Salz überführt wird, welches aufgrund der verringerten Carbonylaktivität weniger reaktiv gegenüber einem nucleophilen Angriff der OH-Gruppe auf Carbonylkohlenstoff ist.<sup>93, 94</sup> Es ist jedoch bekannt, dass die Veresterung eine Gleichgewichtsreaktion ist, deren Gleichgewichtslage nicht nur durch Reaktionsbedingungen, sondern auch durch das Verhältnis der eingesetzten Reagenzien beeinflusst werden kann. Die Gleichgewichtskonstante lässt sich durch Gleichung 23 beschreiben, die zur Gleichung 24 umformuliert werden kann.

$$K_{\text{Gleichgewicht}} = \frac{[\text{Ester}]}{[\text{COOH}] \cdot [\text{OH}]} \quad \text{Gleichung 23}$$

$$[\text{COOH}] = \frac{[\text{Ester}]}{K_{\text{Gleichgewicht}} \cdot [\text{OH}]} \quad \text{Gleichung 24}$$



---

[COOH], [OH] und [Ester] sind die Konzentrationen der Säure-, OH-Gruppe und des gebildeten Esters. Da die Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{Gleichgewicht}}$  bei bestimmten Reaktionsbedingungen konstant bleibt, ist die Konzentration der Säure abhängig von Konzentration der OH-Gruppe und des Produktes. Je höher die Konzentration des Alkohols ist, desto geringer ist die Konzentration der Säure, d.h. die Reaktion läuft in Richtung der Veresterung. Im vorliegenden Fall ist die Konzentration der Säureendgruppe sehr gering, während der Alkohol, PEG, im großen Überschuss vorliegt. Deshalb ist es möglich, dass die Säure trotz der ungünstigen basischen Reaktionsbedingung zum größten Teil zu Ester umgesetzt wird. Durch die Veresterung bildet sich ein PLA-PEG-Copolymer, welches in der SPE spät eluiert. Hierdurch lässt sich nach dem partiellen Abbau mittels MALDI-TOF-MS keine PLA-Fraktion mit Säureendgruppe identifizieren.

Nachdem die Proben bekannter Endgruppen untersucht wurden, konnte nun wieder die Probe PLA1 mit den unbekannten Endgruppen betrachtet werden (siehe Abbildung 47). Im MALDI-Spektrum der SPE-Fraktion 2 dieser Probe wurde eine PLA-Verteilung erkannt, deren Endgruppen zu zyklischem PLA, bzw. den Endgruppenkombinationen Butylester/OH oder Nonylester/OH passen würde. Da die Säureendgruppe nicht identifizierbar war, ist diese auch möglich. Ohne weitere Untersuchung ist es an dieser Stelle unmöglich festzustellen, welche Endgruppenstruktur (Carbonsäure, Butylester, Nonylester oder Zyklen) tatsächlich vorliegt. Es können jedoch andere typische Endgruppen wie z.B. Dodecylester- oder Octylester-Endgruppen ausgeschlossen werden.

Wie in diesem Kapitel gezeigt wurde, konnten unterschiedliche Esterendgruppen durch den Abbau mit PEG2000 mit anschließender SPE-Fraktionierung und MALDI-TOF-Untersuchung identifiziert werden, während die Carbonsäure tragende PLA-Ketten nicht identifiziert werden konnten. Da die Identifizierung im MALDI über die Restmassen erfolgt und diese für zyklisches PLA sowie die Endgruppenkombinationen Butylester/OH und Nonylester/OH, in MALDI-TOF-MS nahezu identisch sind, können diese Strukturen mit der entwickelten Methode nicht klar identifiziert werden.

---

### 5.2.2. GC-MS-Untersuchung

Im letzten Kapitel wurde gezeigt, dass mittels MALDI-TOF-Untersuchung nach dem partiellem Abbau und SPE-Fraktionierung die Charakterisierung unterschiedlicher Esterendgruppen zwar möglich ist, aber Carbonsäure-Endgruppe nicht bestimmt werden können. Weiterhin erlaubt der gewählte Ansatz lediglich die Bestimmung der Endgruppe auf der Carbonyl-Seite (EG<sub>1</sub>), während keine Informationen über die die Endgruppe am anderen Kettenende (EG<sub>2</sub>) erhalten werden können. Darüber hinaus ist die Aufarbeitung der Probe relativ aufwändig, da die Proben zunächst abgebaut werden müssen, wobei die geeigneten Mengen an PLA, PEG und NaOH verwendet werden müssen um ein geeignetes Molekulargewicht zu erreichen, und nach dem Abbau die Proben vor der MALDI-Messung noch fraktioniert werden müssen.

Deshalb wurde nach einer alternativen Methode gesucht, um die Endgruppen schneller und exakter zu identifizieren. In der MALDI-TOF-Untersuchung hatte man gesehen, dass Polylactid sowohl partial als auch vollständig abgebaut werden kann. Da bei einem vollständigen Abbau kleine Moleküle entstehen, die leicht durch Erhitzen verdampft werden können, wäre es möglich die Abbauprodukte mittels GC-MS zu untersuchen und dadurch die Moleküle mit den Endgruppen zu identifizieren. Dabei stellt sich jedoch das Problem, dass die Konzentration der Endgruppen sehr gering ist und mit steigendem Molekulargewicht sinkt. Da die technischen PLA-Proben meistens ein Molekulargewicht von ca. 70 000 g/mol haben, beträgt der Polymerisationsgrad ca. 1000, d.h. nach dem Totalabbau ist die Konzentration der Abbauprodukte aus den Wiederholungseinheiten ca. 1000-fach höher als die Konzentration der aus den Endgruppen resultierenden Moleküle. Da die Nachweisgrenze für MS normalerweise im Nanogrammbereich liegt,<sup>95</sup> soll die Probenkonzentration von PLA ca. 10 g/L betragen, um die Endgruppe bei einem typischen Injektionsvolumen der GC von 1 µL und einem Splitverhältnis von 10 noch identifizieren zu können. Da PLA in diesem Konzentrationsbereich gelöst und abgebaut werden kann, könnte somit die GC-MS zur Endgruppencharakterisierung geeignet sein. Aus diesen Überlegungen heraus wurde versucht, Polylactid vollständig abzubauen und die Abbauprodukte mittels GC-MS zu untersuchen.

Im Vergleich zum partiellen Abbau vor der MALDI-TOF-Untersuchung sollten die Polylactide vollständig abgebaut werden. Hierzu kann ebenfalls eine methanolische Lösung von Natriumhydroxid verwendet werden. Um den Totalabbau zu gewährleisten wurde jedoch die methanolische Lösung im großen Überschuss verwendet (siehe Kap. 6.3.5). Das

Reaktionsschema wird in Abbildung 53 anschaulich dargestellt. Aus jeder Wiederholungseinheit sollte ein Methyllactat-Molekül entstehen. Aus den beiden Enden der Kette entstehen die zu den Endgruppen korrespondierenden Abbauprodukte. Aus einer mit Alkohol initiierten Kette mit OH-Endgruppe sollte somit einerseits der Startalkohol für das eine und Methyllactat für das andere Kettenende resultieren (s. Abbildung 53). Aus einer Kette mit Carbonsäure- und OH-Endgruppe sollten somit Methyllactat und Milchsäure gebildet werden.

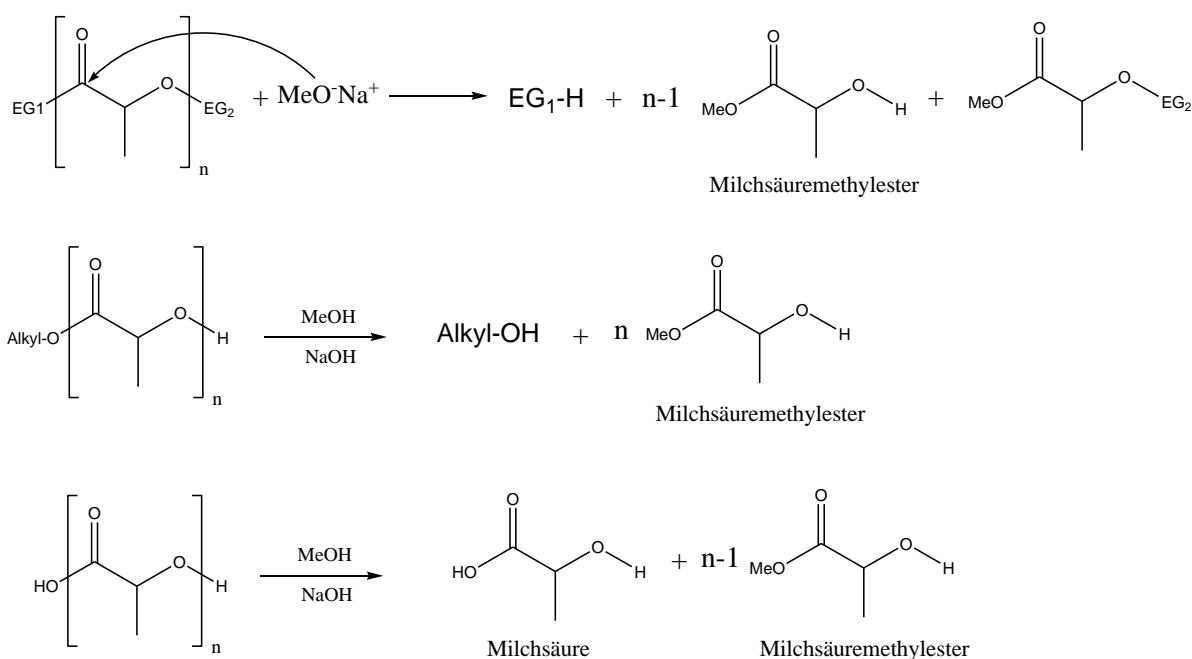


Abbildung 53: Reaktionsschema des Totalabbaus von PLA mit methanolischer NaOH-Lösung. (oben: PLA mit Endgruppen  $EG_1$  und  $EG_2$ ; mitten: PLA mit Alkylester- und Alkohol-Endgruppe; unten: PLA mit Carbonsäure- und Alkohol-Endgruppe)

Um zu überprüfen, ob die angedachte Vorgehensweise erfolgsversprechend ist, wurde zunächst eine Probe mit bekannten Endgruppen untersucht. Hierzu wurde die Probe PLA7, welche eine Butylester- und eine Alkohol-Endgruppe aufweisen sollte, abgebaut und die Produkte mittels GC-MS untersucht. Gemäß dem Reaktionsschema in Abbildung 53 sollten nach dem Abbau Methyllactat und Butanol entstehen. Das GC-Chromatogramm der abgebauten Probe ist in Abbildung 54 dargestellt.

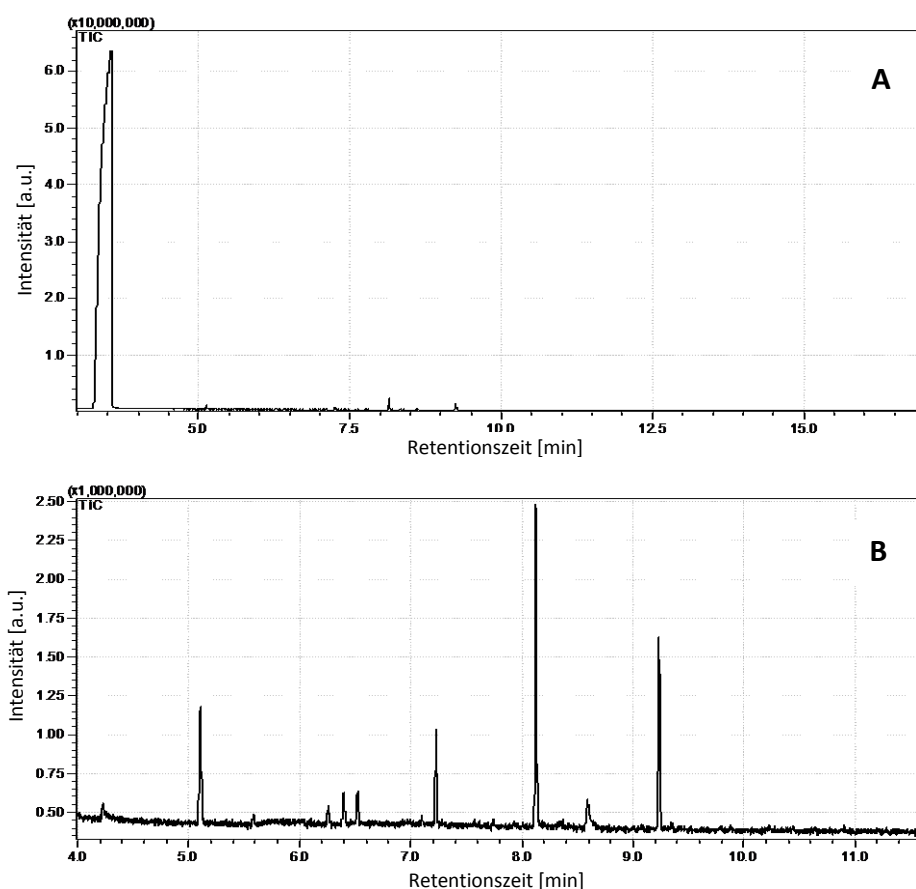


Abbildung 54: GC-Chromatogramm der Probe PLA7 nach dem Totalabbau. (A: gesamtes Chromatogramm; B: Ausschnittsvergrößerung bei Retentionszeiten zwischen 4 und 12 min)

Man erkennt zunächst einen Peak sehr großer Intensität bei 3.5 min. Anhand eines Abgleichs mit Datenbankspektren kann dieser Peak dem entstandenen Methyllactat zugeordnet werden. Dies entspricht der Erwartung, da Methyllactat als Hauptprodukt beim Abbau entstehen sollte. Bei höheren Retentionszeiten sieht man noch weitere Peaks mit viel geringeren Intensitäten, die eventuell auf die Endgruppen zurückzuführen sind. Zur besseren Darstellung wird in Abbildung 54 eine Ausschnittsvergrößerung dargestellt. Man erkennt mehrere Peaks bei Retentionszeiten zwischen 5 bis 10 min. Durch Datenbankabgleich der Massenspektren können den Peaks verschiedene Strukturen zugeordnet werden, die in Tabelle 12 aufgelistet sind:

Tabelle 12: Retentionszeiten und Strukturvorschläge für die Peaks im GC-Chromatogramm der abgebauten Probe PLA7

Retentionszeit [min]	Strukturvorschlag durch Datenbankabgleich der Massenspektren
3.5	Methylactat
8.1	Methylactat
7.25	Butyllactat
8.6	Iso-Lactid
9.25	Tetrahydrofurylchlorid/(Hydroxy-)Methyl-tetrahydrofuran/Butylsäureanhydrid
5.1	Isopropyl-ethyl-ether/1,2-Butandiol
6.4	Butyrolacton
6.5	1,4-Butandiol
6.25	Butansäureanhydrid

Wie man sieht, wird der Peak bei 8.1 min mittels Datenbankabgleich als Methylactat identifiziert. Wie vorhin gezeigt ist, eluiert der Peak von Methylactat jedoch schon bei 3.5 min, deshalb muss dieser Peak auf eine andere Substanz zurückzuführen sein. Vergleicht man die MS-Spektren des Peaks bei 8.1 min mit dem des Peaks bei 3.5 min in Abbildung 55, sieht man dass sich die beiden Spektren zwar sehr ähneln, sich aber bei den Massenpeaks  $m/z = 33$  und  $m/z = 88$  deutlich unterscheiden. Vermutlich handelt es sich bei dem Peak bei 8.1 min um ein Dimer oder eine anderes Milchsäurederivat, das durch Nebenreaktion entstanden ist und für welches kein Referenzspektrum in der Datenbank zur Verfügung steht.

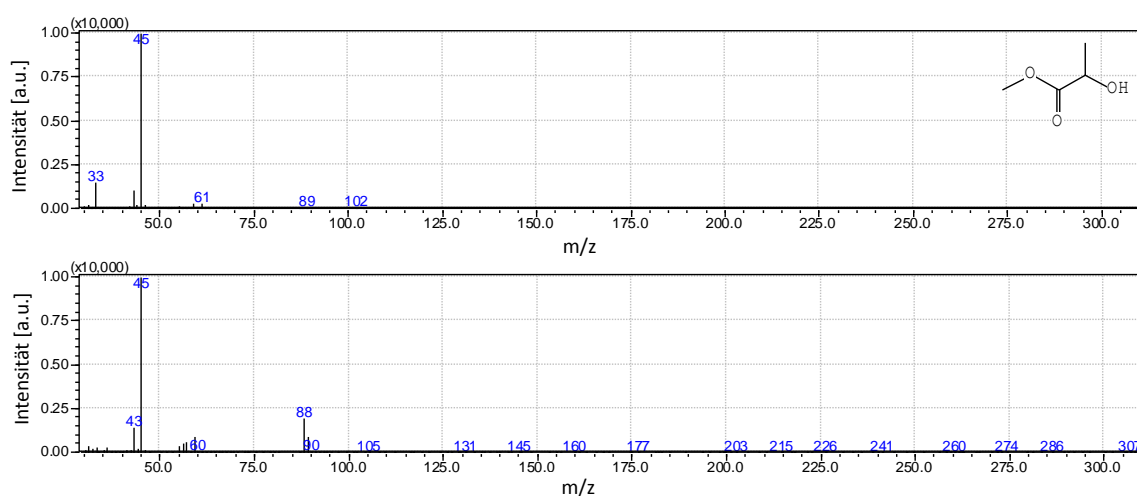


Abbildung 55: Massenspektren des GC-Peaks bei 3.5 min (oben) und 8.1 min (unten) der total abgebauten Probe PLA7.

Der Peak bei einer Retentionszeit von 7.25 min wird als Butyllactat identifiziert. Dieses kann dadurch entstanden sein, dass das durch den Abbau entstandene Butanol, ähnlich wie Methanol, ebenfalls die Polylactid-Ketten angreift und somit einen Butylester bildet.

Der kleine Peak bei 8.6 min wird dem Lactid zugeordnet. Diese kann entweder als Restmonomer im Polymeren vorliegen oder in der Abbaureaktion durch Backbiting entstanden sein.

Außer den oben beschriebenen Peaks beobachtet man noch einige Peaks bei 9.25, 5.1, 6.4, 6.5 und 6.25 min. Die durch Datenbankabgleich der Massenspektren erhaltenen Strukturvorschläge für diese Peaks können durch die Abbaureaktion und die verwendeten Reagenzien nicht erklärt werden. In Hinsicht auf die kleinen Peakintensitäten könnten diese Peaks auf mögliche Verunreinigungen in den Reagenzien oder auf Additive im Polymer zurückzuführen sein. Um zu überprüfen, ob diese Peaks tatsächlich durch das Vorliegen des Polylactids resultieren oder aus Verunreinigungen in den anderen Reagenzien stammen, wurde eine Blindprobe untersucht, d.h. das reine Chloroform ohne PLA, wurde mit der methanolischen NaOH-Lösung versetzt, bei gleichen Bedingungen „reagieren“ gelassen, filtriert und anschließend mit GC-MS vermessen. Das Chromatogramm der „Blindmessung“ wird in Abbildung 56 gezeigt:

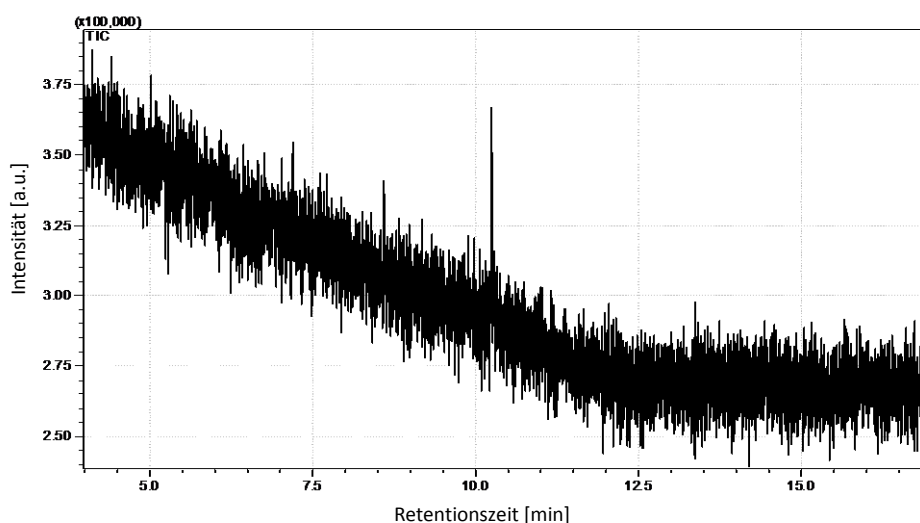
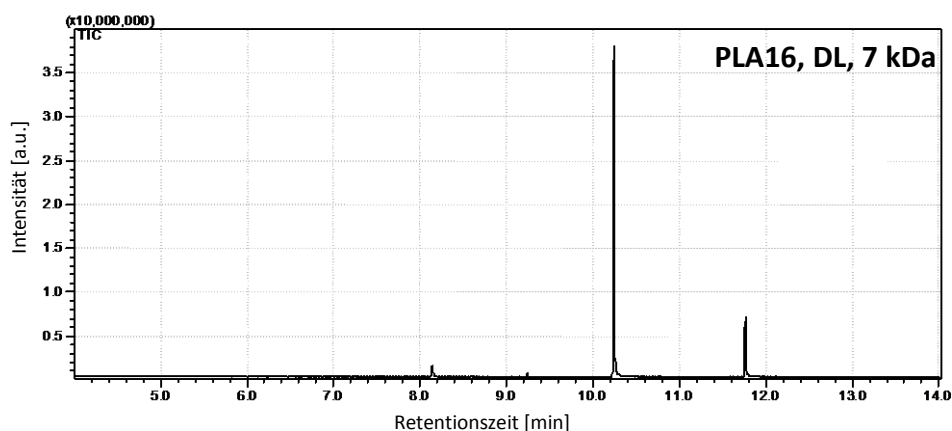


Abbildung 56: GC-Chromatogramm des mit NaOH-MeOH-Lösung behandeltes Chloroforms („Blindmessung“).

Im Chromatogramm der Blindprobe beobachtet man keine Peaks bei den oben genannten Retentionszeiten, was darauf aufweist, dass diese Peaks nicht durch Verunreinigungen verursacht werden, sondern aus dem PLA entstanden sind. Mögliche Quellen wären Additive oder Stabilisatoren, die im PLA enthalten sein können.

Im GC-Chromatogramm des total abgebauten PLA7 wird noch ein Peak für den Startalkohol, 1-Butanol erwartet, der aber nicht beobachtet werden konnte. Ein möglicher Grund dafür wäre, dass 1-Butanol vollständig mit Polylactid reagiert hat und zu Butyllactat umgesetzt ist. Ein anderer Grund ist, dass 1-Butanol wegen seines niedrigen Siedepunktes mit dem Lösungsmittel  $\text{CHCl}_3$  zusammen eluiert. Zur Bestimmung der Elutionszeit des 1-Butanols wurde 1-Butanol mit GC-MS vermessen. Hierfür wurde es in einem hochsiedenden Lösungsmittel, Toluol, aufgelöst, um eine Coelution mit dem Lösungsmittel zu vermeiden. Aus der Messung ergab sich, dass 1-Butanol schon bei 2.26 min eluiert. Bei den Messungen der Abbauprodukte wurde zur Vermeidung der Sättigung des Detektors durch das Lösungsmittel die Aufnahme der Massenspektren erst bei 3 min gestartet. Somit konnte der Peak für Butanol nicht erfasst werden. Der Nachweis des Butanols erfolgt somit anhand des Butyllactats.

Anhand des diskutierten Beispiels wurde exemplarisch nachgewiesen, dass die Butylester-Endgruppe als Butyllactat identifiziert werden kann. Somit könnte die Methode für Endgruppenanalyse geeignet sein. Allerdings wurden auch Peaks beobachtet, die nicht erklärt werden konnten. Um zu überprüfen ob auch andere Endgruppen identifiziert werden können, und für welchen Molekulargewichtsbereich die Methode zur Endgruppenanalyse geeignet ist, sowie um die „unbekannten“ Peaks zu identifizieren, wurden noch weitere Proben mit unterschiedlichen Endgruppen und Molekulargewichten abgebaut und mittels GC-MS untersucht. In Abbildung 57 werden die GC-Chromatogramme der Proben mit Dodecylester- und Alkohol-Endgruppen dargestellt, die sich in ihren Molekulargewichten und in ihrer stereochemischen Zusammensetzung unterscheiden.



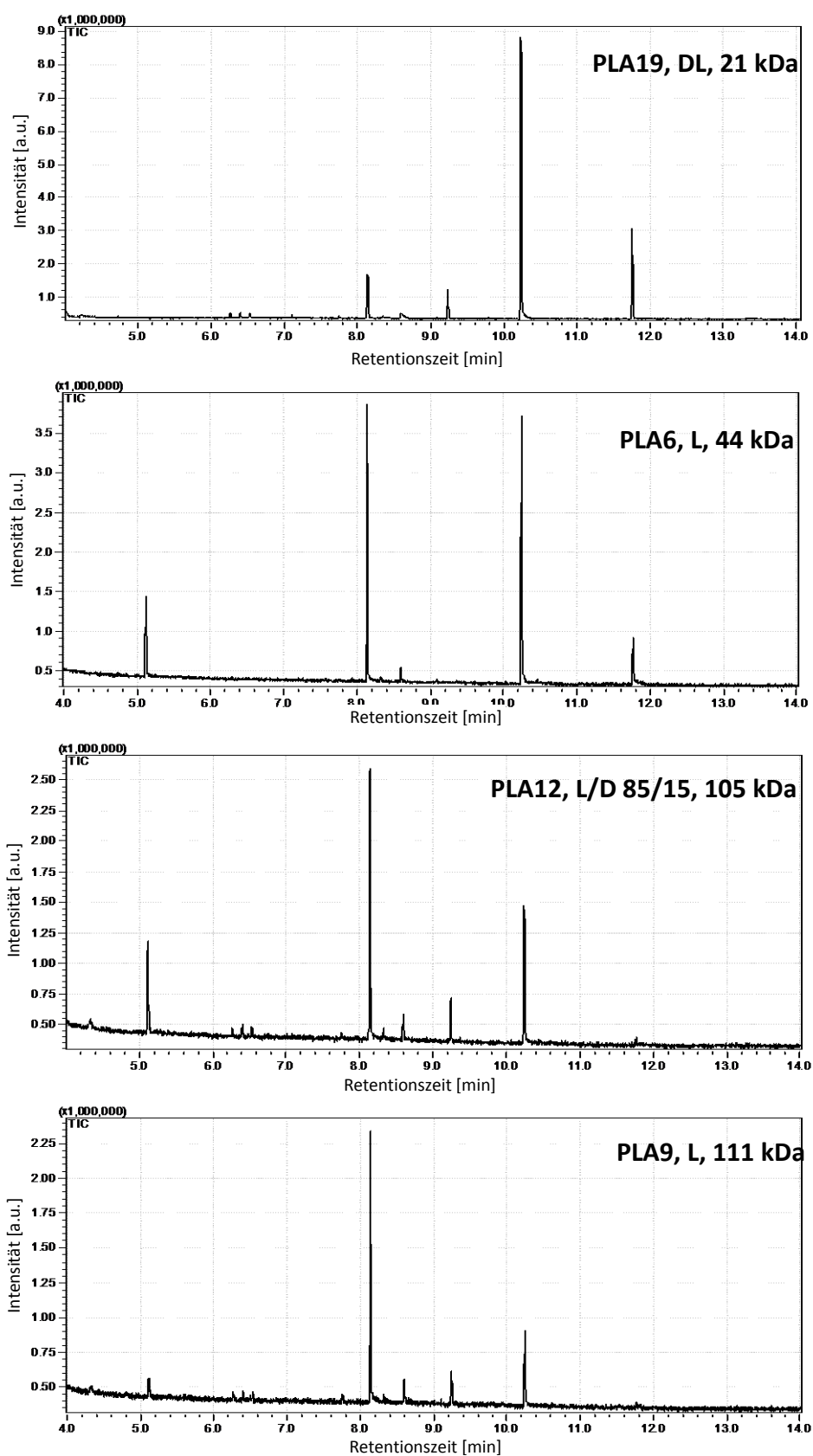


Abbildung 57: GC-Chromatogramme der Proben mit Dodecyl- und OH-Endgruppen nach dem Totalabbau. (Beschriftungen: Probennamen, stereochemische Zusammensetzung und das zahlenmittlere Molekulargewicht)



Aus den Chromatogrammen lassen sich folgende Informationen gewinnen:

- Bei jeder Probe erkennt man einen Peak bei 10.23 min, welches durch Datenbankabgleich des Massenspektrums als 1-Dodecanol identifiziert wird. Dieser Peak wird erwartet, weil alle gezeigten Proben Dodecylester-Endgruppe besitzen. Die Intensität dieses Peaks nimmt bei gleicher eingesetzter Menge an PLA mit steigendem Molekulargewicht ab, wobei die Peakhöhe bei PLA16 ( $M_n = 7$  kDa)  $3.7 \cdot 10^7$  beträgt und bei PLA9 ( $M_n = 111$  kDa) nur noch  $2.3 \cdot 10^6$  beträgt. Wird die Peakfläche gegen  $1/M_n$  aufgetragen, beobachtet man eine annähernd lineare Abhängigkeit (s. Abbildung 58). Dies entspricht der Erwartung, weil die Konzentration der Endgruppe umgekehrt proportional zum Molekulargewicht ist.

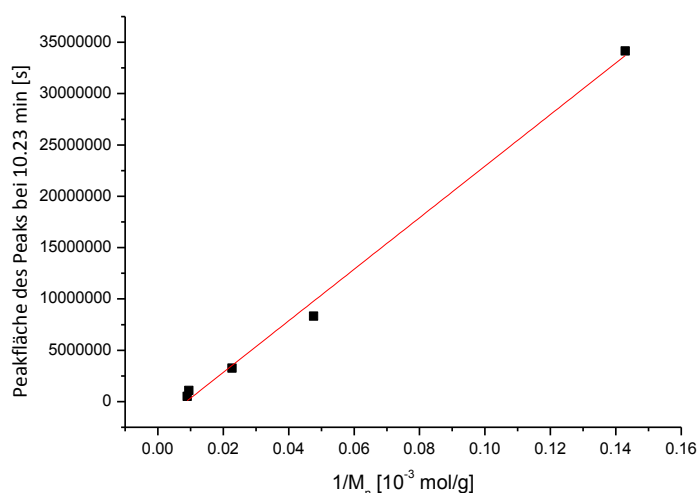


Abbildung 58: Peakfläche des Peaks bei 10.23 min aufgetragen gegen reziproke Molekulargewicht  $1/M_n$  für die Proben in Abbildung 58.

- Bis auf die Probe PLA9 zeigt jede Probe einen weiteren Peak bei 11.75 min. Wie beim Dodecanol-Peak verringert sich die Intensität dieses Peaks mit steigendem Molekulargewicht. Bei PLA16 ( $M_n = 7$  kDa) hat der Peak die Höhe von  $2 \cdot 10^6$ , und bei PLA9 (111 kDa) verschwindet schon der Peak im Rauschen. Die durch die Datenbank vorgeschlagene Identifizierung als Methoxyessigsäuredodecylester ist unwahrscheinlich, da diese Substanz durch die Abbaureaktion nicht entstehen kann. Wie oben für die Probe PLA7 gezeigt wurde, kann der freigesetzte Startalkohol mit PLA reagieren und das korrespondierende Lactat bilden. Daher könnte im vorliegenden Fall das freigesetzte Dodecanol ebenfalls eine Umesterung bewirken und der Peak bei 11.73 min somit zu Dodecylactat korrespondieren, dessen

Massenspektrum in der Datenbank jedoch nicht gespeichert ist, und für welches somit keine positive Identifizierung erfolgen kann. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde Dilactid und Dodecanol unter NaOH-Katalyse zur Reaktion gebracht und mittels GC-MS vermessen. Ähnlich wie bei der Abbaureaktion von PLA soll hierbei eine Umesterung des Lactids stattfinden und Dodecylactat entstehen. Im GC-Chromatogramm (Abbildung 59) sieht man die Peaks der beiden Dilactid-Isomere bei 8.3 und 8.6 min, den Peak des 1-Dodecanol bei 10.23 min und auch den Peak bei 11.75 min, der anhand des Massenspektrums erneut dem Methoxyessigsäuredodecylester zugewiesen wird. Daraus lässt sich schließen, dass der Peak bei 11.75 min tatsächlich auf Dodecylactat zurückzuführen ist.

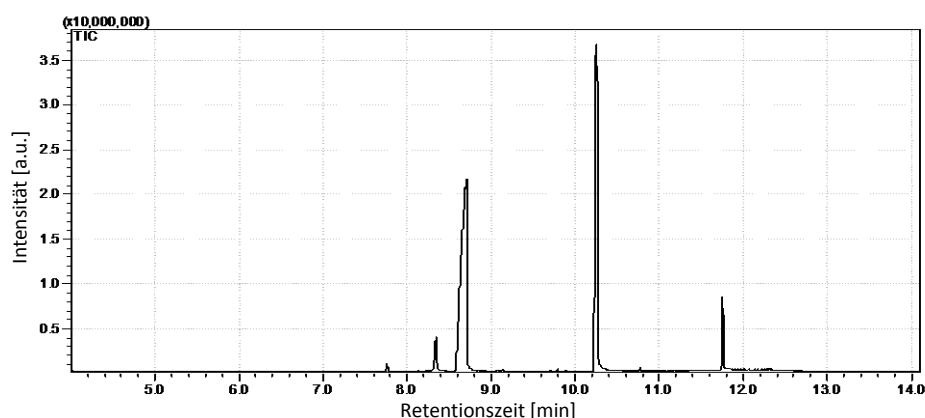


Abbildung 59: GC-Chromatogramm der Reaktionsmischung aus L-Lactid, Dodecanol unter NaOH-Katalyse.

- Ebenso wie PLA7 zeigen auch die mit Dodecanol gestarteten Proben den „Methylactat-Peak“ bei 8.1 min, der wie oben vermutet aus Dimeren oder einem anderen Milchsäurederivat stammt. Die Tatsache, dass sowohl die Probe mit Butylester-Endgruppe als auch die Proben mit Dodecylester-Endgruppe den Peak aufweisen, ist ein Hinweis darauf, dass dieser Peak nicht durch die Endgruppe hervorgerufen wird. Die Peakintensität des Peaks bleibt unabhängig vom Molekulargewicht annähernd konstant.
- Bei jeder Probe beobachtet man noch weitere Peaks geringer Intensität bei 8.6 min und 8.32 min, die für Dilactid stehen. Wie bei PLA7 ist Lactid entweder auf Monomerreste aus der Herstellung des Polymeren oder auf Backbiting-Reaktion bei der Probenvorbereitung und -aufarbeitung zurückzuführen.
- Die „unbekannten“ Peaks bei 9.25, 5.1, 6.4, 6.5 und 6.25 min, die schon bei PLA7 auftraten, erscheinen auch bei den Proben mit Dodecylester-Endgruppe. Den Peak bei 5.1 min zeigen die Proben PLA6, PLA12 und PLA9, den Peak bei 9.25 min die

---

Proben PLA16, PLA19, PLA9, und die Peaks bei 6.4, 6.5 und 6.25 min die Proben PLA19 und PLA9. Da die Proben sowohl unterschiedliche Endgruppen besitzen als auch von unterschiedlichen Herstellern stammen aber dennoch identische Peaks zeigen, beruhen diese Peaks offenbar nicht auf bestimmten Endgruppen oder Additive, sondern sind eher durch Nebenreaktion des PLA mit der methanolischen NaOH-Lösung entstanden. Die genaue Ursache ist unbekannt.

Für die Proben mit Dodecylester-Endgruppe kann somit festgestellt werden, dass bei allen Proben unterschiedlicher stereochemischer Zusammensetzungen für Molekulargewichte im Bereich von 7 kDa bis 111 kDa die Endgruppe als Dodecanol und Dodecylactat mittels GC-MS identifiziert werden kann.

In den bisher diskutierten Beispielen wurden Proben untersucht, die mit einem Alkohol gestartet wurden und über Ester- und OH-Endgruppen verfügen sollten. Bei den Untersuchungen zur partiellen Spaltung mit nachfolgender MALDI-TOF-MS-Untersuchung konnten derartige Strukturen ebenfalls charakterisiert werden. Hingegen gelang es nicht PLAs die über eine Säureendgruppe verfügen eindeutig zu charakterisieren. Daher wurde geprüft, ob dies durch Totalabbau und GC-MS gelingt. Hierzu wurden die Proben mit Carbonsäure- und Alkohol-Endgruppe abgebaut und untersucht. Die erhaltenen GC-Chromatogramme sind in Abbildung 60 dargestellt. Entsprechend der Reaktionsgleichung in Abbildung 53 sollten aus den Wiederholungseinheiten Methyllactat und aus der Endgruppe Milchsäure entstehen.

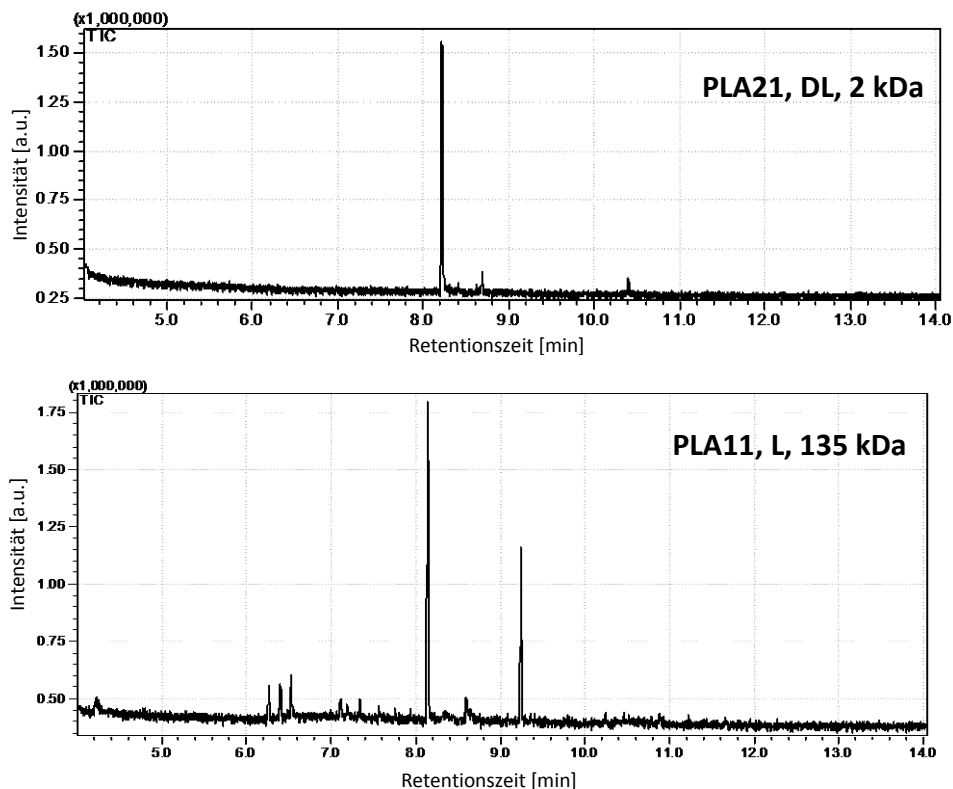


Abbildung 60: GC-Chromatogramme der Proben unterschiedlicher Molmassen und Stereochemie mit Carbonsäure- und OH-Endgruppen. (Beschriftungen: Probenamen, stereochemische Zusammensetzung und die zahlenmittleren Molekulargewichte)

In den Chromatogrammen lassen sich jedoch nur der schon bekannte Peak für Methyllactat bei 8.1 min sowie der Peak für Dilactid bei 8.6 min erkennen. Zusätzlich erkennt man für PLA11 die schon bekannten, aber nicht zuordnenbaren Peaks (ab hier summarisch als „unbekannte Peaks“ bezeichnet) bei 5.1, 9.25, 6.4, 6.5 und 6.25 min. Alle dieser Peaks wurden oben schon diskutiert und liefern keine zusätzlichen Informationen über die vorliegenden Endgruppen.

Insbesondere kann der erwartete Peak für Milchsäure, der auf die Carbonsäure-Endgruppe hinweisen sollte, nicht identifiziert werden. Wie im Kap.5.2.1 diskutiert wurde, könnte Milchsäure unter den Reaktionsbedingungen zu Methyllactat verestert werden. Das entsprechende Reaktionsprodukt wäre dann identisch zu demjenigen der Wiederholungseinheit und die Säure-Endgruppe könnte somit nicht identifiziert werden. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde eine Modell-Reaktion zwischen Milchsäure und methanolischer NaOH-Lösung durchgeführt. Hierzu wurde Milchsäure in einer Konzentration von 1 g/L gelöst, in einer ähnlichen Konzentration wie beim Abbau von PLA21 vorliegen sollte. Anschließend wurde die Lösung analog zum Abbau der Polylactide behandelt und

mittels GC-MS untersucht. Das erhaltene GC-Chromatogramm ist in Abbildung 61 (B) wiedergegeben. Zum Vergleich wurde auch reine Milchsäure vermessen, deren Chromatogramm in Abbildung 61 (A) gezeigt wird.

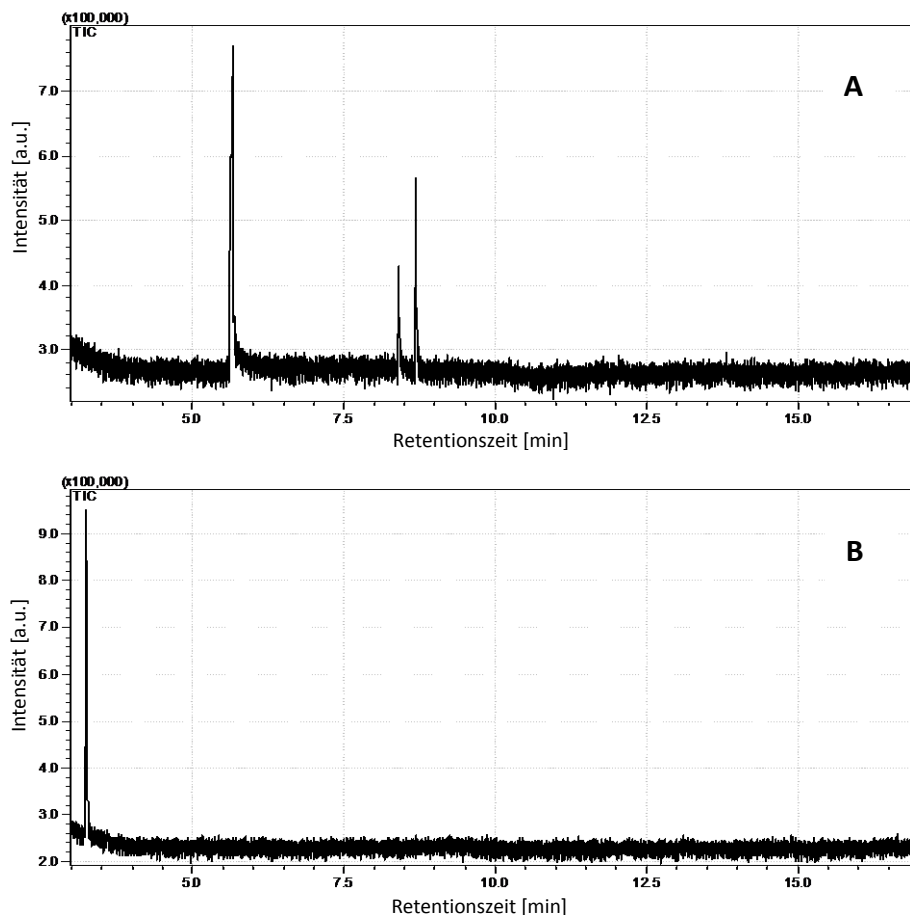


Abbildung 61: GC-Chromatogramme der Milchsäure (A) und des Reaktionsproduktes aus Milchsäure und der methanolischen NaOH-Lösung (B).

Im Chromatogramm der Milchsäure werden ein Peak für Milchsäure bei 5.6 min, und zwei Peaks für Lactid bei 8.32 min und 8.6 min beobachtet. Das Lactid entsteht durch Dimerisierung und Zyklisierung der Milchsäure, die wahrscheinlich bei der Lagerung der Milchsäure oder beim Verdampfen der Probe während der GC-Messung stattgefunden sind. Nach der Reaktion mit Methanol unter Katalyse des NaOH ist im GC-Chromatogramm nur ein Peak bei 3.6 min für Methyllactat gesehen. Dies deutet darauf hin, dass unter den Reaktionsbedingungen die Milchsäure vollständig verestert wurde. Somit kann hier festgestellt werden, dass die Veresterung auch in der alkalischen Lösung stattfindet hat, wobei die Säure-Endgruppe ebenso wie die Wiederholungseinheiten des PLA zu Methyllactat umgesetzt wird. Daher lässt sich die Carbonsäureendgruppe in der GC-MS nicht identifizieren. Somit lässt sich auch erklärt werden, warum bei der MALDI-TOF-

Untersuchung nach dem partiellen Abbau mit PEG2000 und der SPE-Fraktionierung die PLA-Verteilung für Carbonsäure-Endgruppen nicht identifiziert werden konnte. Wie in Kapitel 5.2.1 vermutet wurde, wurde beim partiellen Abbau das PLA mit Säure-Endgruppe ebenfalls durch PEG verestert, wodurch ein PLA-PEG-Copolymer gebildet wurde, welches bei der Aufreinigung mittels SPE-Fraktionierung aus der PLA-Fraktion entfernt wurde.

Neben den oben untersuchten Proben wurden auch Proben mit anderen Endgruppen, bei deren Synthese 1-Octanol oder 1,4-Butandiol als Startalkohol verwendet wurde, vollständig abgebaut und mittels GC-MS untersucht. Die GC-Chromatogramme werden im Anhang (Kap. 8) beigelegt. Bei all diesen Proben konnte der Startalkohol ebenfalls mittels GC-MS identifiziert werden.

Anhand der GC-MS-Untersuchung nach dem Totalabbau konnte nachgewiesen werden, dass bei Proben mit Alkylester-Endgruppe die Endgruppen identifiziert werden können, während bei Proben mit Carbonsäure-Endgruppe die Carbonsäure wegen Veresterung durch Methanol nicht identifiziert werden kann.

Nachdem die Möglichkeiten und Grenzen der erarbeiteten Methode ermittelt waren, wurde nun die technische Probe PLA1, deren Endgruppen unbekannt sind, untersucht. Das korrespondierende Gaschromatogramm wird in Abbildung 62 gezeigt:

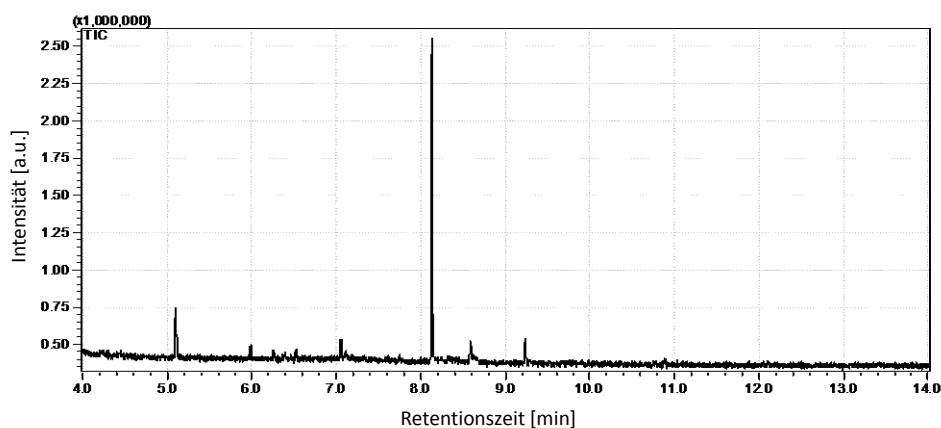


Abbildung 62: GC-Chromatogramm des PLA1 nach dem Totalabbau.

Im Chromatogramm lassen sich folgende Peaks identifizieren:

- „Methylactat-Peak“ bei 8.1 min
- Lactid-Peak bei 8.6 min
- die „unbekannten“ Peaks bei 5.1, 9.25, 6.4, 6.5 und 6.25 min

Alle dieser Peaks resultieren wie oben gezeigt aus PLA und sind unabhängig von den vorliegenden Endgruppen. Es konnten keine zu Endgruppen korrespondierenden Peaks

---

beobachtet werden. Möglicherweise hat die Probe Carbonsäure-Endgruppen, die wie oben beschrieben nicht identifiziert werden können. Außerdem ist es auch möglich, dass die Retentionszeiten der Peaks außerhalb des Bereichs der Datenaufnahme liegen oder die Peakintensitäten zu klein sind um detektiert werden zu können. An den Beispielen der mit Dodecanol gestarteten Proben (s. Abbildung 57) wurde festgestellt, dass die Endgruppen für Molekulargewichte bis zu 111 kDa nachgewiesen werden können. Da die Probe PLA1 ein Molekulargewicht von 74 kDa aufweist, sollten die Peakintensitäten der Endgruppen noch in der Nachweisgrenze liegen.

Am Ende des Kapitels 5.2.1 wurde gezeigt, dass die Massenspektren der partiell abgebauten Probe PLA1 durch Carbonsäure-Endgruppen, Butylester- und Nonylester-Endgruppen sowie Zyklen erklärbar sind. Durch die GC-MS-Untersuchung nach Totalabbau können nun die Butylester- und Nonylester-Endgruppe ausgeschlossen werden, da im GC-Chromatogramm keine Peaks, die zu diesen Endgruppen korrespondieren, beobachtet werden. Somit sind noch Carbonsäure-Endgruppen und Zyklen möglich, da beide beim Totalabbau zu Methyllactat führen sollten, welches jedoch für alle PLA-Proben entsteht und somit keine weitere Aussage über die Endgruppe zulässt. Da es bei der Herstellung des PLA sehr unwahrscheinlich ist, dass sich bei der Synthese alle Ketten zyklisieren, sind die vorliegenden Ergebnisse am sinnvollsten durch das Vorliegen von Carbonsäure-Endgruppen zu erklären.

Nach dem Reaktionsschema in Abbildung 53 sollte durch den Totalabbau noch ein Molekül mit der Information über die Endgruppe am anderen Kettenende ( $EG_2$ ) entstehen. Wenn  $EG_2$  eine Alkohol-Endgruppe ist, entsteht daraus wie aus jeder Wiederholungseinheit auch Methyllactat. Wenn das Kettenende durch End-Capping geschützt wird, sollte man das dazu korrespondierende Molekül in GC-MS identifizieren können. Da im GC-Chromatogramm kein weiterer Peak beobachtet werden konnte, ist die  $EG_2$  wahrscheinlich eine Alkohol-Endgruppe, oder das  $EG_2$  tragende Molekül hat einen zu hohen oder zu niedrigen Verdampfungspunkt, so dass es außerhalb des Bereichs der Datenaufnahme eluiert.

Im Vergleich zur MALDI-TOF-MS-Untersuchung im Kap. 5.2.1 bietet der Totalabbau mit anschließender GC-MS-Untersuchung viele Vorteile. Erstens ist die Probenaufarbeitung einfacher, da nach dem Abbau keine aufwändige Fraktionierung notwendig ist. Zweitens können prinzipiell die Endgruppen beider Kettenenden bestimmt werden, während in der MALDI-TOF-Untersuchung nur die Endgruppe auf der Carbonyl-Seite ( $EG_1$ ) bestimmt werden können. Drittens können Endgruppen, für welche die gleichen Restmassen resultieren, wie z.B. PLA-Zyklen und die Endgruppenkombinationen Butylester/OH, Nonylester/OH, in der GC-MS unterschieden werden, während dies mittels MALDI-TOF-MS unmöglich ist.

---

Mit beiden Methoden konnte Carbonsäure-Endgruppen nicht identifiziert werden, welches auf die Veresterung der Carbonsäure durch den zum Abbau verwendeten Alkohol zurückzuführen ist. Die Kombination beider Methoden lässt jedoch Rückschlüsse auf das Vorliegen von Carbonsäureendgruppen zu. Somit sollte man für die Endgruppenbestimmung zunächst eine Totalhydrolyse mit anschließender GC-MS-Untersuchung durchführen. Finden sich hier keine Signale für die potentiellen Endgruppen, kann die resultierende Vermutung über das Vorliegen von Carbonsäureenden durch MALDI-TOF-Untersuchungen nach partiellem Abbau untermauert werden.



---

### 5.2.3. Trennung nach Endgruppen mittels Chromatographie

Neben MALDI-TOF-MS und GC-MS bietet auch die HPLC eine Möglichkeit, Endgruppen in Polymeren zu bestimmen. Im Vergleich zu den ersten beiden Methoden, die direkt Information über die Struktur der Endgruppen einer Probe liefern, ist die HPLC ein Trennverfahren. Dies bedeutet, dass zunächst, basierend auf Proben mit bekannten Endgruppen, eine geeignete Trennmethode entwickelt werden muss. Durch Vergleich der Retentionszeiten von Referenzproben mit Proben unbekannter Endgruppen ist es dann möglich das Vorliegen von bestimmten Endgruppen zu verifizieren. Mittels HPLC lassen sich jedoch auch Veränderungen der Endgruppenverteilungen durch die Prozessführung, Verarbeitung oder Alterung schnell untersuchen. Der entscheidendste Vorteil der HPLC gegenüber den beiden anderen Methoden liegt jedoch darin, dass prinzipiell nicht nur die Art der Endgruppen identifiziert werden kann, sondern auch, wie sich diese über die verschiedenen Ketten verteilen.

Zur Entwicklung der Methode standen die in Tabelle 8 aufgeführten Proben zur Verfügung. Wie im Kap.5.2.1 gezeigt wurde, wird PLA auf einer stationären Phase von Kieselgel in 100 %  $\text{CHCl}_3$  adsorbiert und durch Erhöhung des THF-Anteils im Elutionsmittel desorbiert. Durch die unterschiedlich starken adsorptiven Wechselwirkungen der unterschiedlichen Endgruppen könnte sich somit u.U. eine Trennung erzielen lassen. Da Kieselgel eine Normalphase ist, sollte Proben höherer Polaritäten stärker adsorbiert werden als Proben niedrigerer Polaritäten, d.h. die stärker polare Säure-Endgruppe sollte einen stärkeren Adsorptionseffekt aufweisen als die weniger polaren Ester-Endgruppen. Zur Überprüfung dieser Aussage wurden PLA-Proben unterschiedlicher Molekulargewichte, Endgruppen und stereochemischer Zusammensetzungen in einem Gradienten von  $\text{CHCl}_3$  nach THF vermessen. Da PLA gemäß den HPLC-Messungen im Kap.5.2.1 schon bei ca. 10 % THF eluieren sollte, wurde der Gradient bei 30 % THF beendet, um Messzeit und Lösungsmitteln zu sparen. Die erhaltenen Chromatogramme sind nachfolgend dargestellt:

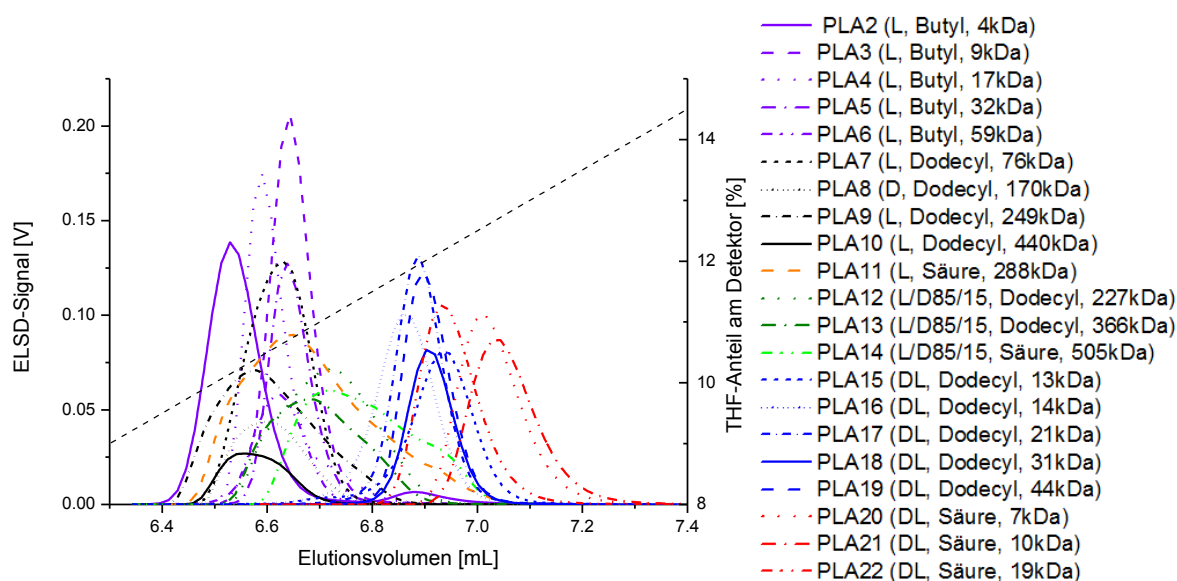


Abbildung 63: Elugramme der PLA-Proben in einem Gradienten  $\text{CHCl}_3$  nach 30% THF. (Proben in 1 g/L in  $\text{CHCl}_3$  gelöst. Säule: Nucleosil 1000 Å, 7 $\mu$ ; Injektionsvolumen = 50  $\mu\text{L}$ ; T = 35 °C; Flussrate = 1 mL/min; Mobile Phase: 0–1 mL  $\text{CHCl}_3/\text{THF}$  = 100/0; 6–7 mL  $\text{CHCl}_3/\text{THF}$  = 70/30; 7.01 mL  $\text{CHCl}_3/\text{THF}$  = 100/00; 16 mL nächste Injektion). Die schwarze gestrichelte Linie gibt den THF-Anteil im Eluenten am Detektor an.

In den Chromatogrammen erkennt man für jede Probe einen Peak, der zu unterschiedlichen Zusammensetzungen von  $\text{CHCl}_3/\text{THF}$  korrespondiert. Dabei eluieren alle Proben in einem engen Bereich der Eluentenzusammensetzung bei THF-Anteilen zwischen 9 und 14 %. Da das Elutionsvolumen von den Parametern Molekulargewicht, Endgruppenfunktionalität und stereochemischer Zusammensetzung beeinflusst werden kann, sind die einzelnen Abhängigkeiten aus Abbildung 63 nur schwer zu extrahieren. Um die Abhängigkeit besser zu sehen, wurde in Abbildung 64 das Molekulargewicht gegen das Elutionsvolumen aufgetragen, wobei die unterschiedlichen stereochemischen Zusammensetzungen bzw. Endgruppen mit unterschiedlichen Farben und Symbolen dargestellt werden.

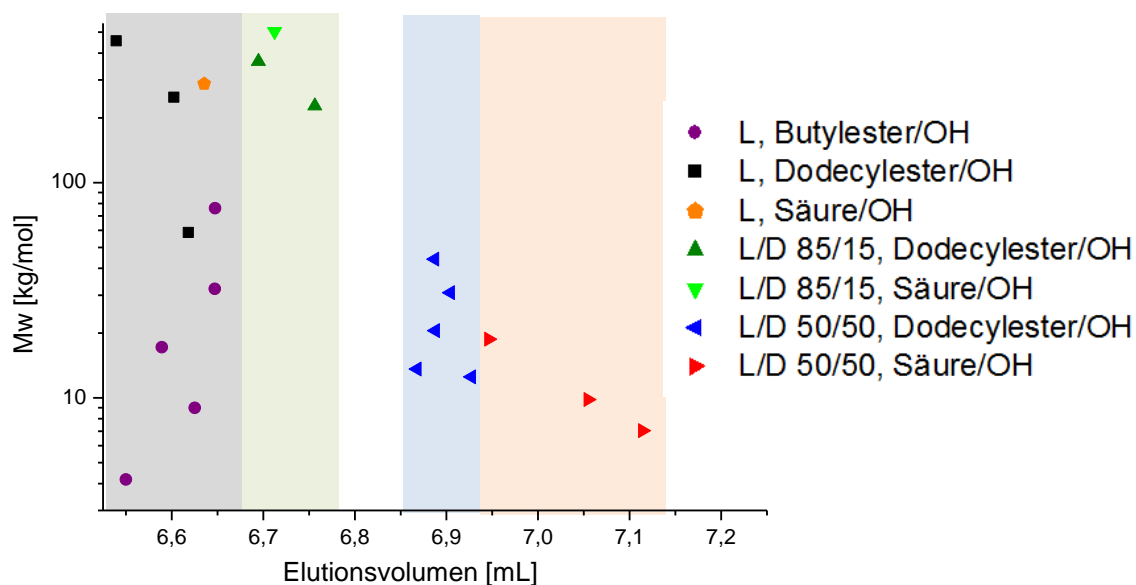


Abbildung 64: Molekulargewichte aufgetragen gegen das Elutionsvolumen für die Messungen in Abbildung 63.

In Abbildung 64 ist deutlich zu erkennen, dass die reinen L-PLAs (PLLA) früher eluieren (im grau markierten Bereich) als die L/D-Mischungen mit dem L/D-Verhältnis von 85/15 (grün markiert). Erst bei höheren Elutionsvolumen eluieren die PDLLAs mit dem L/D-Verhältnis von 50/50. Das Elutionsvolumen scheint daher mit der stereochemischen Zusammensetzung zu korrelieren. Dies scheint zunächst schwer verständlich, da die hier verwendete stationäre Phase (Kieselgel) eine achirale Phase ist. Jedoch kann eine achirale Phase zwar keine Enantiomere, wie z.B. D- und L-PLA gleicher Molmasse, unterscheiden, aber zur Trennung von Diastereomeren, wie PLAs unterschiedlicher L/D-Verhältnisse, führen.

Bei den PLLAs und den L/D-Mischungen mit dem Verhältnis 85/15 konnte kein Endgruppeneffekt beobachtet werden, während bei den PDLLAs die Proben mit Säure/OH-Endgruppen später eluieren als die mit Dodecylester/OH-Endgruppen. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass der Endgruppeneffekt normalerweise bei Proben kleiner Molekulargewichte signifikanter sein sollte, da der Anteil der adsorptiven Endgruppen gegenüber dem Anteil der desorptiven Wiederholungseinheiten bei kleinerem Molekulargewicht größer ist, was insgesamt zu einem stärkeren Adsorptionseffekt führt. Die PLA Proben mit 100 % bzw. 85 % L-Anteil, die Säure-Endgruppe haben, weisen Molekulargewichte von über 200 kDa auf, deshalb ist anzunehmen, dass der Effekt der Endgruppe in einem Gradienten zu gering ist um eine Trennung zu erzielen. Im Vergleich

---

dazu haben die PDLLAs mit Säure-Endgruppe viel geringere Molekulargewichte von unter 20 kDa, wobei eine stärkere Adsorption durch die Säure-Endgruppe als die Dodecylester-Endgruppe erkannt werden konnte.

Insgesamt wird das Elutionsvolumen jedoch deutlich von der stereochemischen Zusammensetzung beeinflusst, wobei PLAs mit niedrigem Enantiomerenüberschuss bei höheren Elutionsvolumen eluieren. Bei den niedermolekularen Proben wird Elutionsvolumen auch von Endgruppen beeinflusst, wobei die Proben mit Säure-Endgruppe stärker adsorbieren als diejenigen mit Dodecylester-Endgruppe. Jedoch sieht man in Abbildung 63, dass alle Peaks sehr nah aneinander liegen. Eine vollständige und saubere Trennung nach Stereochemie oder Endgruppen war unter diesen Messbedingungen somit nicht möglich. Um die Trennung zu verbessern, sollte die kritische Chromatographie herangezogen werden. Hierzu sollten zuerst die kritischen Punkte für PLAs unterschiedlicher stereochemischer Zusammensetzungen identifiziert werden, wobei PLAs gleicher Stereochemie beim gleichen Elutionsvolumen eluieren. Unter diesen Bedingungen sollten nur noch die Endgruppen einen Effekt auf das Elutionsvolumen haben, wodurch eine Trennung nach Endgruppen möglich wäre.

### **LCCC für reine L- und D-Polylactide**

Basierend auf der oben beschriebenen Überlegung wurde zuerst versucht, den kritischen Punkt für die reinen PLLAs zu bestimmen.

Anhand der Messungen mit dem Gradienten von  $\text{CHCl}_3$  nach 30 % THF (siehe Abbildung 63) wurde festgestellt, dass die PLLAs und PDLAs bei einem Anteil von ca. 10 % THF eluieren. Diese Zusammensetzung sollte somit nahe an der kritischen Eluentenzusammensetzung liegen.<sup>74,75</sup> Zur genauen Bestimmung wurden die L- und D-PLAs in unterschiedlichen  $\text{CHCl}_3$ /THF-Zusammensetzungen von 92/8, 91.5/8.5, 91/9, 90.5/9.5, 90/10 und 89.5/10.5 isokratisch vermessen. Hierzu wurden die Proben im Eluenten gelöst, um eventuellen desorbierenden oder adsorbierenden Effekt des Lösemittels zu vermeiden. In Abbildung 65 sind für unterschiedliche Eluentenzusammensetzungen die Molekulargewichte gegen das Elutionsvolumen aufgetragen.

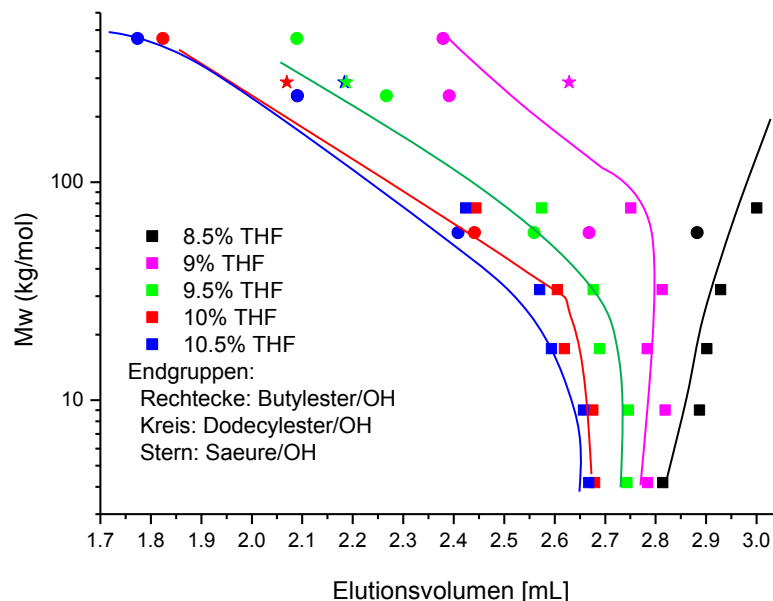


Abbildung 65: Elutionsvolumen aufgetragen gegen gewichtsmittleres Molekulargewicht für die isokratischen Messungen in Eluenten unterschiedlicher  $\text{CHCl}_3/\text{THF}$ -Zusammensetzungen. Proben unterschiedlicher Endgruppen werden in unterschiedlichen Punktformen gekennzeichnet. (Proben in 1 g/L in entsprechenden Eluenten gelöst. Säule: Nucleosil 1000 Å, 7 $\mu$ ; Injektionsvolumen = 50  $\mu\text{L}$ ; T = 35 °C; Flussrate = 1 mL/min)

Bei einem THF-Anteil von weniger als 8 % werden alle Proben auf der stationären Phase adsorbiert. Bei einem THF-Anteil von 8.5 % kann ein Teil der Proben von der Säule eluieren. Man erkennt jedoch, dass bei 8.5 % THF die Proben im Adsorptionsmodus eluieren, d.h. dass das Elutionsvolumen mit dem Molekulargewicht zunimmt. Proben mit Molekulargewichten über 100 kDa eluieren unter diesen Bedingungen nicht.

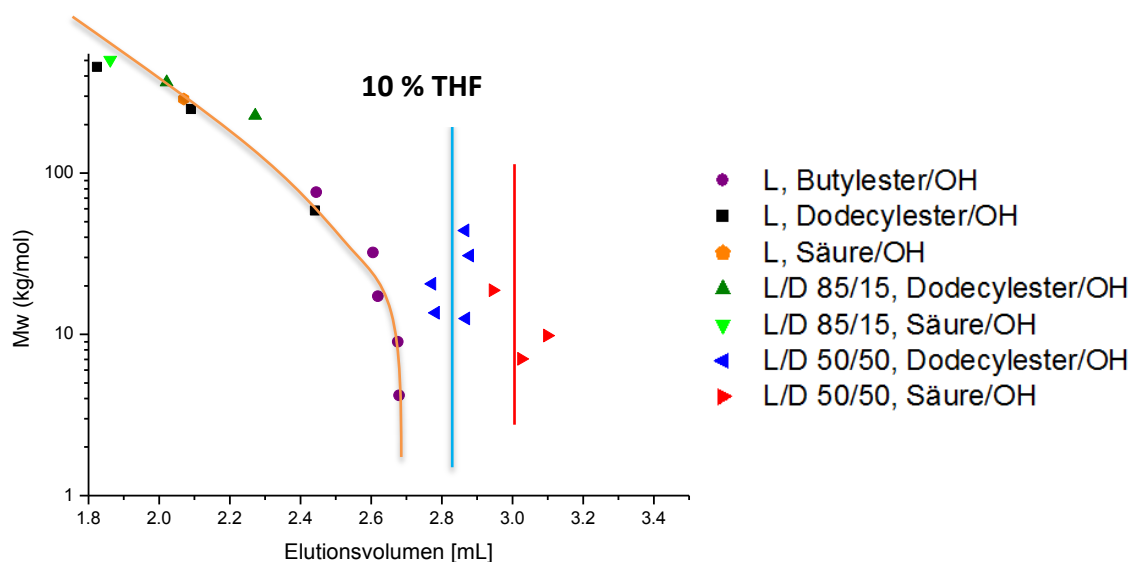
Bei 9 % THF hingegen eluieren die Proben mit Molekulargewichten unter 100 kDa nahezu bei gleichem Elutionsvolumen, während die Proben höherer Molekulargewichte bei kleineren Elutionsvolumen eluieren. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die ideale kritische Zusammensetzung, wobei sich die entropischen und enthalpischen Effekte gerade komplett kompensieren, in einem sehr engen Bereich liegt, und gerade für Proben mit hohen Molekulargewichten experimentell sehr schwierig einzustellen ist. In der Realität liegt immer eine geringe Abweichung zwischen der experimentell ermittelten kritischen Zusammensetzung und dem Idealfall vor. Je höher die Molekulargewichte sind, desto empfindlicher reagieren die Proben auf geringste Abweichungen von der kritischen Eluentenzusammensetzung.

Bei einem THF-Anteil über 9.5 % THF neigt sich die Elution klar auf die Seite der SEC, wo das Elutionsvolumen mit zunehmendem Molekulargewicht sinkt. Aus den Messungen lässt sich somit folgen, dass der kritische Punkt sehr nahe an dem Verhältnis  $\text{CHCl}_3/\text{THF}$  91/9 liegt.

Bei den Messungen bei 9 % THF zeigt die Probe mit Säure-Endgruppe ein größeres Elutionsvolumen und damit eine stärkere Adsorption als die Probe vergleichbarer Molmasse mit Dodecylester-Endgruppe. Wegen der Peaküberlappung konnte jedoch eine klare Trennung nicht erzielt werden.

### LCCC für Poly(DL-Lactide)

Nachdem der kritische Punkt für PLLAs bzw. PDLAs bestimmt war, wurde nun der kritische Punkt für die PDLLAs ermittelt. In der Gradientenmessung eluierten diese Proben bei ca. 12 % THF. Ähnlich wie bei den D- und L-PLAs wurden die PDLLA-Proben in Laufmitteln  $\text{CHCl}_3/\text{THF}$  91/9, 90.5/9.5, 90/10 und 89.5/10.5 isokratisch chromatographiert, wobei die Proben im entsprechenden Eluenten gelöst wurden. Es wurde festgestellt, dass bei einem THF-Anteil unter 9.5 % THF die Proben auf der stationären Phase adsorbiert werden. Ab 10 % THF konnten die Proben eluiert werden. In Abbildung 66 sind für THF-Anteile von 10 und 10.5 % die Molekulargewichte gegen Elutionsvolumen aufgetragen.



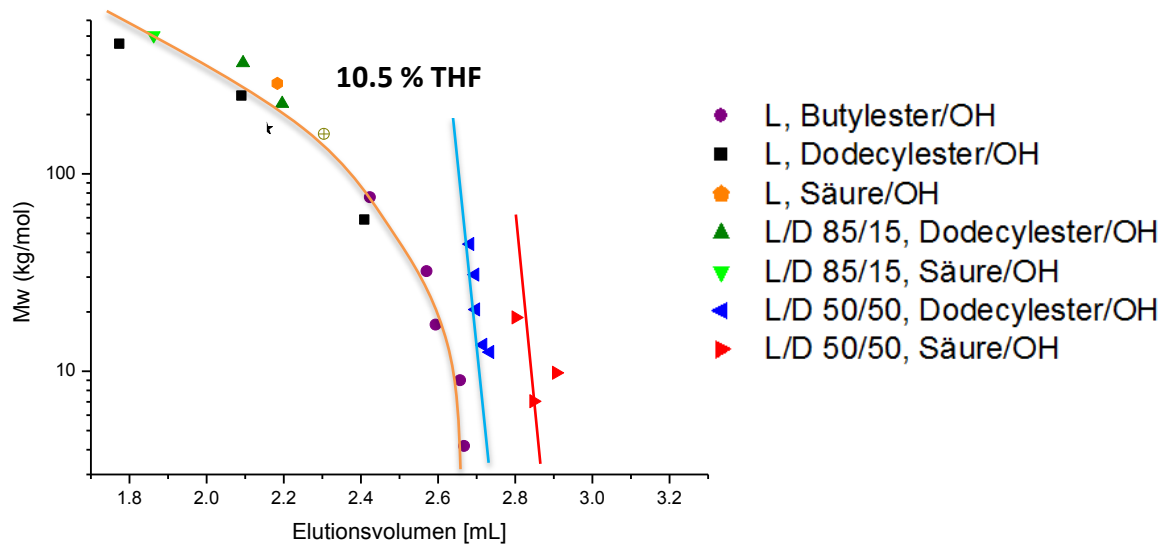


Abbildung 66: Elutionsvolumen aufgetragen gegen gewichtsmittleres Molekulargewicht für isokratische Messungen in Laufmitteln mit unterschiedlichen  $\text{CHCl}_3/\text{THF}$ -Zusammensetzungen. Proben unterschiedlicher Endgruppen werden durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet. (Proben in 1 g/L in entsprechenden Eluenten gelöst. Säule: Nucleosil 1000 Å, 7 $\mu$ ; Injektionsvolumen = 50  $\mu\text{L}$ ; T = 35 °C; Flussrate = 1 mL/min)

Bei 10 % THF eluieren die PDLLAs mit Dodecylester/OH-Endgruppe bei nahezu identischem Elutionsvolumen. Die PDLLAs mit Säure/OH-Endgruppe eluieren geringfügig später. Die PLLAs, PDLA und D/L-Mischungen mit dem Verhältnis 85/15 eluieren hingegen unabhängig von den Endgruppen und stereochemischen Zusammensetzungen früher als die PDLLAs im SEC-Modus, d.h. in der Reihenfolge der Molekulargewichte.

Bei einem THF-Anteil von 10.5 % neigt sich die Kalibrationskurve der PDLLAs nach links. Dies bedeutet, dass sich das Elutionsvolumen mit dem Molekulargewicht verringert, was typisch für eine Elution im SEC-Modus ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der kritische Punkt für PDLLAs bei ca. 10 % THF liegt. Hierbei wurde zwar eine stärkere Adsorption der Säure-Endgruppe als die Dodecylester-Endgruppe beobachtet, aber die Elutionsvolumen liegen so dicht an einander, dass sich die Peaks überlagern und somit keine klare Trennung erzielt wird.

## Messungen mit einem Stufengradienten von $\text{CHCl}_3$ nach THF

Nach der Bestimmung der kritischen Punkte für PLAs unterschiedlicher stereochemischer Zusammensetzungen wurde versucht, die Proben unter Verwendung des in Abbildung 67 gezeigten Gradienten zu trennen.

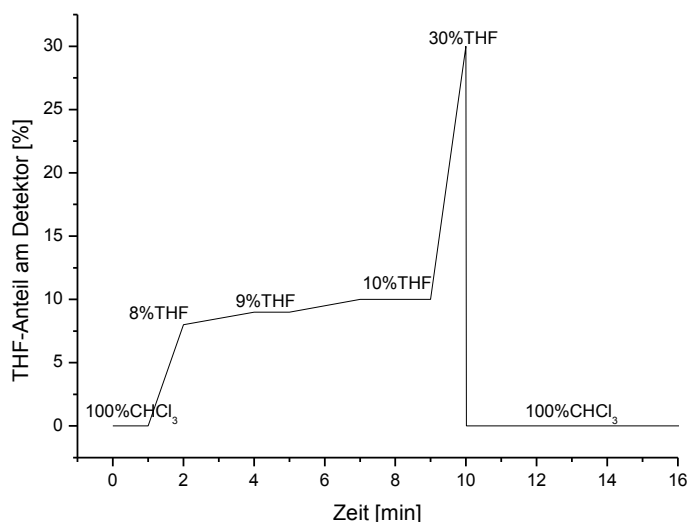


Abbildung 67: Programmiertes Gradientenprofil. (mobile Phase: 0-1 min  $\text{CHCl}_3$ /THF = 100/0; 2 min  $\text{CHCl}_3$ /THF = 92/8; 4-5 min  $\text{CHCl}_3$ /THF = 91/9; 7-9 min  $\text{CHCl}_3$ /THF = 90/10; 10 min  $\text{CHCl}_3$ /THF = 70/30; 10.01 min  $\text{CHCl}_3$ /THF = 100/0; 16 min nächste Injektion)

Werden die Proben zuerst in 100 %  $\text{CHCl}_3$  auf die stationäre Phase injiziert erfolgt die Adsorption. Durch schnelle Erhöhung des THF-Anteils auf 8 % sollten die Proben immer noch auf der stationären Phase adsorbiert bleiben. Anschließend wird der THF-Anteil langsam auf 9 % erhöht, also die kritische Eluentenzusammensetzung für PLLA und PDLA erhöht. Somit sollten die PLLAs und PDLAs eluieren. Schließlich wird der THF-Anteil weiter auf 10 % gesteigert, damit die PDLLAs ihren kritischen Punkt erreichen und eluieren. Die L/D-Mischungen mit dem Verhältnis 85/15 sollten zwischen den PLLAs und PDLLAs eluieren. Schließlich wird die stationäre Phase noch mit 30 % THF gespült, um sicherzustellen, dass alle Proben aus der Säule eluiert werden.

Die Chromatogramme mit dem oben beschriebenen Gradienten sind in Abbildung 68 dargestellt:



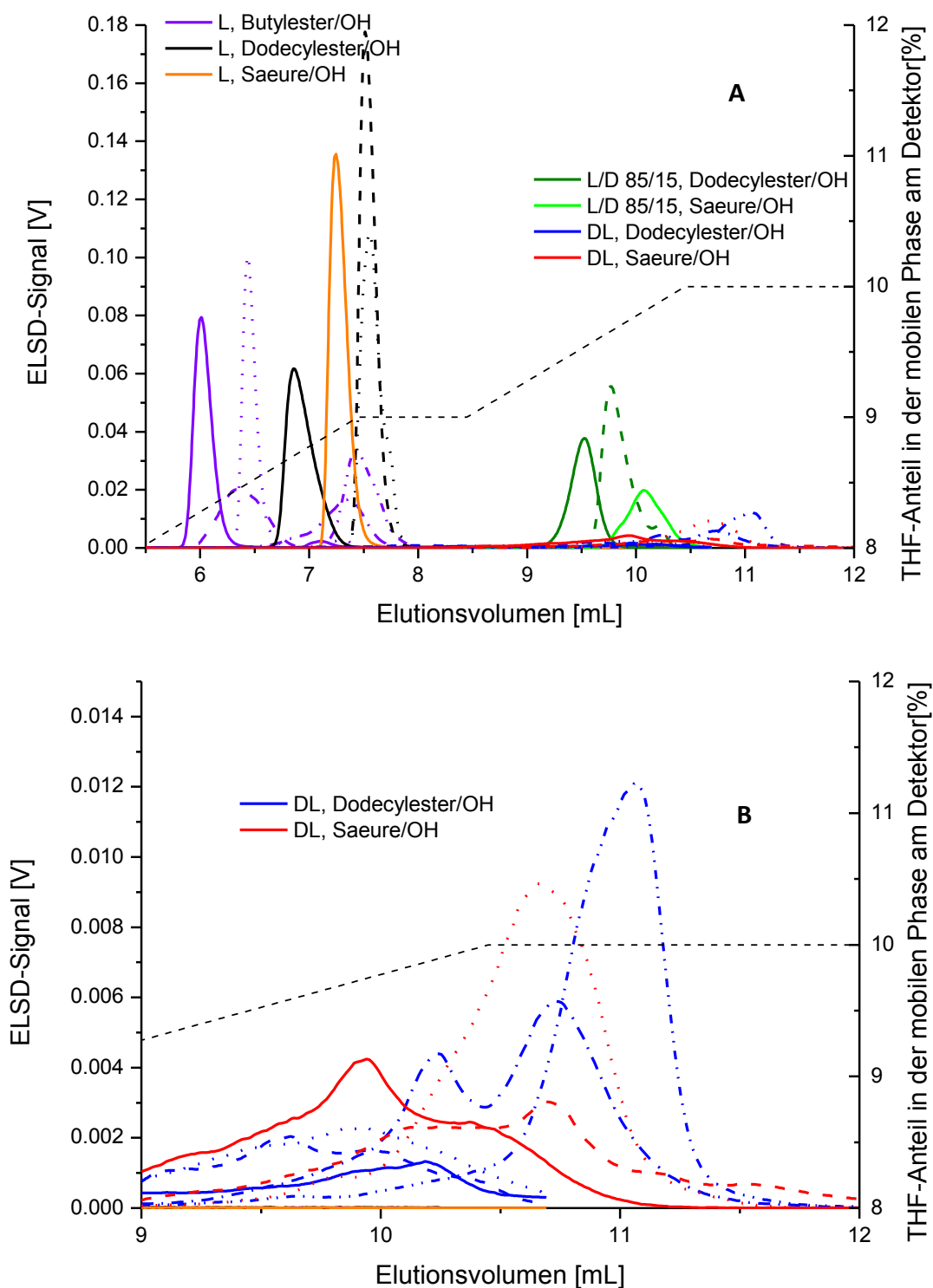


Abbildung 68: Chromatogramme der PLA-Proben bekannter stereochemischer Zusammensetzungen und Endgruppen mit dem Gradienten in Abbildung 67. (**A**: gesamte Chromatogramme; **B**: gezoomte Chromatogramme der PDLLAs. Proben wurden in  $\text{CHCl}_3$  gelöst. Säule: Nucleosil 1000 Å, 7 $\mu$ ; Injektionsvolumen = 50  $\mu\text{L}$ ;  $T = 35^\circ\text{C}$ ; Flussrate = 1 mL/min)

In den Chromatogrammen erkennt man, dass zuerst die PLLAs und PDLA bei einem THF-Anteil von 8-9 % eluieren, welches der oben beschriebenen Erwartung entspricht. Werden die Molekulargewichte gegen das Elutionsvolumen aufgetragen (s. Abbildung 69), erkennt man, dass das Elutionsvolumen nur vom Molekulargewicht abhängt, aber kein deutlicher Endgruppeneffekt festgestellt werden kann.

Man erkennt weiterhin, dass die L/D-Mischungen mit dem Verhältnis 85/15 erst bei höheren Elutionsvolumen im Gradienten von 9 % nach 10 % THF eluieren. Auch dies ist im Einklang mit der Erwartung. In Abbildung 69 sieht man, dass für diese Proben das Elutionsvolumen ebenfalls mit steigendem Molekulargewicht zunimmt, während ein Endgruppeneffekt nicht identifiziert werden konnte.

Die PDLLAs zeigen jeweils einen breiten Peak mit Peakaufspaltung, der über mehrere Minuten bei einem THF-Anteil von 9-10 % verteilt ist. Das breite Peakverhalten ist wahrscheinlich auf die Überlagerung der Effekte des Molekulargewichts, der Endgruppen und der stereochemischen Zusammensetzung zurückzuführen. Wegen Überlagerung der Peaks war hier eine Trennung dieser Proben nach Endgruppen nicht möglich.

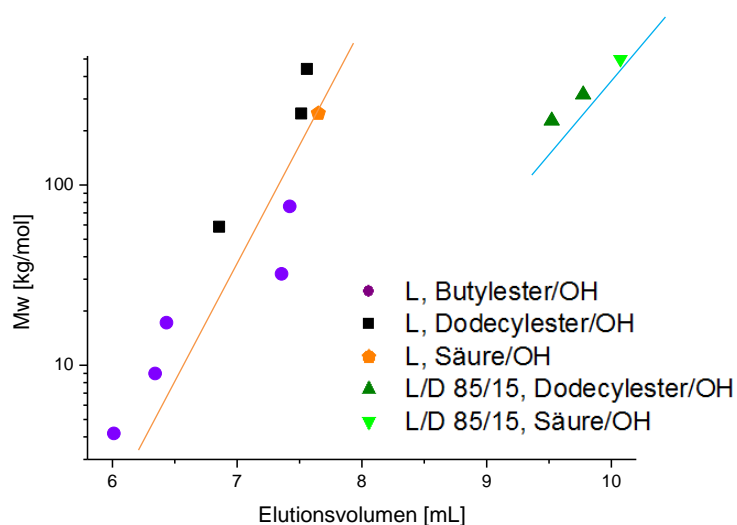


Abbildung 69: Molekulargewichte der PLLAs, PDLA und L/D-Mischungen mit dem Verhältnis 85/15 aufgetragen gegen Elutionsvolumen der Messungen in

Abbildung 68.

Unter Verwendung des Stufengradienten ist es möglich die reinen D- und L-PLAs aus den L/D-Mischungen zu trennen. Eine Trennung nach Endgruppen konnte jedoch nicht erzielt werden.

---

In diesem Kapitel wurden Untersuchungen zu den Endgruppen in PLA durchgeführt. Durch partielle Methanolyse gefolgt von MALDI-TOF-MS-Messungen konnten unterschiedliche Ester-Endgruppen identifiziert werden, wobei aber Endgruppen gleicher Molekulargewichte nicht unterschieden werden konnten. Die anschließende Totalmethanolyse mit nachfolgender GC-MS erlaubte eine schnellere Identifizierung verschiedener Ester-Endgruppen und eine Unterscheidung der Endgruppen mit gleichen Molmassen. Schließlich wurde versucht, mittels HPLC eine Methode zu entwickeln, um PLAs nach unterschiedlichen Endgruppen zu trennen. Es konnte gezeigt werden, dass PLLAs und PDLLAs geringfügig unterschiedliche kritische Punkte aufweisen. Dabei konnte zwar ein geringer Endgruppeneffekt bei niedermolekularen Proben beobachtet werden, aber wegen der Peaküberlagerung war es unmöglich die Proben nach Endgruppen zu trennen. Basierend auf diesen kritischen Punkten wurde ein Stufengradient entwickelt, mit dem es gelang reine PLLAs von L/D-Mischungen zu trennen. Die Messungen haben gezeigt, dass die Elution der PLAs auf der Kieselgel-Phase hauptsächlich von der stereochemischen Zusammensetzung beeinflusst wird und Endgruppeneffekte nur von untergeordneter Bedeutung sind.

---

## 6. Experimenteller Teil

---

### 6.1. Lösungsmitteln und Chemikalien

In der vorliegen Arbeit wurden folgende Lösungsmitteln verwendet:

- Chloroform (HPLC Grade) und Methanol (HPLC Grade) wurden von der Firma VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen und verwendet wie geliefert.
- Technisches Tetrahydrofuran von BASF (Ludwigshafen, Deutschland) wurde über Calciumhydrid der Firma Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) getrocknet und anschließend destilliert.
- Trifluorethanol war Produkt von Chempur (Karlsruhe, Deutschland).

Die zum partiellen oder vollständigen Abbau der PLA-Proben verwendeten Chemikalien sind:

- Natriumhydroxid-Plätzchen der Firma VWR in Darmstadt, Deutschland (Vor Verwendung wurden die Plätzchen zu Pulver gemörsert.)
- Polyethylenglykolmonomethylether mit dem mittleren Molekulargewicht von 350 g/mol und 2000 g/mol (PEG350 und PEG2000) der Firma Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

In MALDI-TOF-Messungen wurde als Adduktbildner Litiumchlorid (wasserfrei, 99%, zur Analyse) der Firma Acros Organics (Geel, Belgien) verwendet. Als Matrix wurde eine Lösung von Dithranol (>97%) der Firma Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) in Dioxan (VWR in Darmstadt, Deutschland) benutzt.

In der GC-MS-Untersuchung wurden L-Lactid, 1-Dodecanol und 1-Octanol und D,L-Milchsäure eingesetzt, die von der Firma VWR bezogen wurden.

Die zur Kalibration der SEC verwendeten Polystyrol-Standards wurden von PSS Polymer Standards Service (Mainz, Deutschland) hergestellt.

Das in den Lichtstreuungsmessungen von PHB verwendete Kaliumtrifluoracetat (KTFAC) wurde von Fluka Chemie (Buchs, die Schweiz) gekauft.

## 6.2. Proben

Die Hersteller der PLA-Proben werden in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Herkunft der PLA-Proben

Proben	Herkunft
PLA1	NatureWorks LCC (Minnetonka, USA)
PLA2-5, 7	Polish Academy of Science, Abteilung Polymerchemie (Lodz, Poland)
PLA6, 8-14, 16, 17, 20, 22, 23	Böhringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Ingelheim, Deutschland)
PLA15, 18, 19, 21	Purac Biochem (Gorinchem, die Niederlande)
PLA24-29	Synthetisiert von Mirjam Weis, Fraunhofer LBF, Bereich Kunststoffe Gruppe Grenzflächendesign (Darmstadt, Deutschland)

Die Herkunft der PHB-Proben wurden in Tabelle 1 im Kap. 5.1 angegeben.

## 6.3. Probenvorbereitung

### 6.3.1. Partiieller Abbau des PLA mit NaOH-MeOH-Lösung

Zuerst wurde die PLA-Probe, im Fall dieser Arbeit die technische Probe PLA1, in einer Konzentration von 20 g/L in THF auf einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 90 °C und 500 rpm über Nacht gerührt und aufgelöst. Natriumhydroxid wurde in Methanol in einer Konzentration von 5 g/L gelöst.

Anschließend wurde 1 mL der PLA-Lösung mit unterschiedlichen Mengen (5-40 µL) der methanolischen NaOH-Lösung versetzt. Um die Reaktionsdauer zu untersuchen, wurde die Lösung kurz mit Hand gerührt und über unterschiedliche Reaktionszeiten stengelassen. In Abbildung 29 wurde gezeigt, dass die Reaktion nach maximal 20 Minuten schon vollständig abgelaufen ist, deshalb wurden die anschließenden Reaktionen alle mit einer Reaktionszeit von 20 min durchgeführt.

Nach dem Ende der Reaktion wurden 200 µL der Lösung mit 800 µL THF (mit 0.1 % Toluol als interner Standard) verdünnt, woraus eine Probenkonzentration von 4 g/L resultiert. Die Proben wurden durch ein Spritzenvorsatzfilter (0.45 µm Acrodisc®-Spritzenvorsatzfilter mit GHP-Membran der Firma PALL) filtriert und die Molekulargewichte der Abbauprodukte relativ zu Polysytrol mittels SEC bestimmt.

Aufgrund der Ungenauigkeiten beim Pipettieren wurden beim Auflösen und Mischen der Reaktionslösungen die Mengen an Reagenzien, Lösungsmitteln und Lösungen eingewogen,

um die genauen Konzentrationen und Mischverhältnisse der Lösungen berechnen zu können. In Tabelle 14 werden die Mengen der Reagenzien für verschiedene Abbauprobversuche zusammengefasst. Wird angenommen, dass Methanol vollständig mit PLA reagiert hat und statistisch die PLA-Ketten spaltet, lassen sich die theoretischen mittleren Molekulargewichte der abgebauten Proben berechnen. Diese sind ebenfalls in Tabelle 14 aufgeführt und mit den mittels SEC ermittelten Molekulargewichten verglichen.

Tabelle 14: Genaue Reaktionsmengen, theoretische und experimentell bestimmte Molekulargewichte der Reaktionsprodukte.

Probe	Volumen der NaOH-Lsg. in MeOH [ $\mu$ L]	Masse PLA [mg]	Masse MeOH [mg]	Masse NaOH [ $\mu$ g]	M <sub>n</sub> theoretisch [g/mol]	M <sub>n</sub> nach SEC [g/mol]
PLA-Abbau7	8	17.4	6.2	39	90	6300
PLA-Abbau8	14	18.9	11.0	69	Totalabbau	1200
PLA-Abbau9	19	19.1	14.7	93	Totalabbau	800
PLA-Abbau10	24	18.8	19.0	120	Totalabbau	500
PLA-Abbau11	19	18.8	22.9	144	Totalabbau	300
PLA-Abbau12	39	18.9	30.9	195	Totalabbau	Totalabbau

### 6.3.2. Partieller Abbau des PLA mit PEG350

Wie beim Abbau mit MeOH wurde zuerst PLA1 in 20 g/L in THF auf dem Thermomixer bei 90 °C und 500 rpm über Nacht aufgelöst. Gleichzeitig wurden 2.5 mg NaOH, 0.5 mL PEG350 und 0.5 mL THF gemischt und ebenfalls auf dem Thermomixer gerührt. Nach dem Auflösen wurde 1 mL der PLA-Lösung mit jeweils 40-100  $\mu$ L der PEG-Lösung versetzt um unterschiedliche Molekulargewichte der Produkte zu erhalten. Die Reaktionsgemische wurden mindestens 2 Stunden bei RT auf dem Thermomixer gerührt, um eine vollständige Reaktion zu gewährleisten.

Für die SEC-Messungen wurden 200  $\mu$ L des Reaktionsgemischs mit 800  $\mu$ L THF (0.1% Toluol) verdünnt, um eine PLA-Konzentration von ca. 4 g/L zu erhalten. Die Lösungen wurden vor der Messung durch ein Spritzenvorsatzfilter (0.45  $\mu$ m Acrodisc®-Spritzenvorsatzfilter mit GHP-Membran der Firma PALL) filtriert. Für die Gradienten-HPLC-Messungen (Abbildung 34) wurden 50  $\mu$ L der Reaktionslösung abgedampft, mit 1 mL CHCl<sub>3</sub> wieder aufgelöst und vor der Messung auch durch Spritzenvorsatzfilter filtriert. Somit beträgt die Konzentration des PLA ca. 1 g/L.

Die Mengen der Reagenzien, sowie die theoretische und durch SEC ermittelte Molekulargewichte für die Abbauprobversuche werden in Tabelle 15 wiedergegeben:

Tabelle 15: Genaue Reaktionsmengen, theoretische und experimentell bestimmte Molekulargewichte der Reaktionsprodukte.

Probe	Volumen der NaOH-PEG-Lsg. in THF [ $\mu$ L]	Masse PLA [mg]	Masse PEG350 [mg]	Masse NaOH [ $\mu$ g]	M <sub>n</sub> theoretisch [g/mol]	M <sub>n</sub> nach SEC [g/mol]
PLA-PEG1	40	19.2	20.9	105	674	7175
PLA-PEG2	60	20.5	30.7	154	580	5275
PLA-PEG3	80	20.5	41.4	208	523	3496
PLA-PEG4	100	20.5	48.8	245	494	2721

Ähnlich wie beim Abbau mit MeOH ist auch im vorliegenden Fall das theoretische Molekulargewicht viel kleiner als das durch SEC ermittelte Molekulargewicht, was durch die zwei Möglichkeiten erklärt werden kann, die in Kap. 6.3.1 beschrieben wurden.

### 6.3.3. Partieller Abbau des PLA mit PEG2000

Wie beim Abbau mit PEG350 wurden die PLA-Proben mit Ausnahme der Probe PLA9 in 20 g/L in THF aufgelöst. Da die Probe PLA9 ein reines PLLA ist und in THF unlöslich ist, wurde sie in CHCl<sub>3</sub> in der gleichen Konzentration gelöst. PEG2000 wurde in einer Konzentration von 200 g/L in THF bzw. beim Abbau von PLA9 in CHCl<sub>3</sub> gelöst. Zum Auflösen des PLA bzw. PEG wurden die Lösungen auf dem Thermomixer bei 90 °C und 500 rpm über Nacht gerührt. Danach wurde 1 mg NaOH eingewogen und mit der PLA- und PEG-Lösung zu unterschiedlichen Verhältnissen versetzt, die in Tabelle 16 wiedergegeben werden.

Tabelle 16: Einwaage an NaOH, Volumen der PLA- und PEG-Lösung in den Reaktionsgemischen PLA-PEG5-7 sowie beim Abbau von PLA9, PLA7 und PLA21.

Probe	Einwaage NaOH [mg]	Volumen der PLA-Lsg. [mL]	Volumen der PEG2000-Lsg. [mL]
PLA-PEG5	0.96	0.5	0.5
PLA-PEG6	1.09	0.4	0.8
PLA-PEG7	0.96	0.8	0.4
Abbau von PLA9	1.02	0.8	0.4
Abbau von PLA7	1.01	0.8	0.4
Abbau von PLA21	1.02	0.8	0.4

Die Reaktionsmischungen wurden bei 60 °C und 550 rpm auf den Thermomixer über Nacht reagieren gelassen.

Für die SEC-Messungen wurden 200 µL der Lösung mit dem entsprechenden Lösemittel, CHCl<sub>3</sub> bei PLA9 und THF bei den anderen Proben, auf 1 mL verdünnt und filtriert. Die SEC-Messung für die abgebaute Probe PLA9 wurde in CHCl<sub>3</sub> als Elutionsmittel durchgeführt, während die anderen abgebauten Proben in THF vermessen wurden.

Für die Messungen mittels Gradientenchromatographie wurden 100 µL der Reaktionsmischung abgedampft, mit 1 mL CHCl<sub>3</sub> wieder aufgenommen und vermessen.

Für SPE-Fraktionierung wurden 150 µL der Reaktionslösung abgedampft, mit 1 mL CHCl<sub>3</sub> wieder gelöst und durch SPE fraktioniert.

#### 6.3.4. Festphasenextraktion (SPE)

Zur Festphasenextraktion wurden mit Kieselgel gepackte SPE-Kartuschen Strata® SI-1 Silica 500 µg/3 mL (55 µm 70 Å) der Firma Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) eingesetzt. Zum Absaugen wurde ein Vakuumextraktionsgerät Adsorbex® SPU (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Abtropfgeschwindigkeit konnte durch das Drehventil grob eingestellt werden und betrug ca. 1 mL/min.

Zur Bestimmung der Beladungsgrenze der Kartusche wurden 2 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg und 25 mg PEG2000 in CHCl<sub>3</sub> aufgelöst und auf jeweils eine SPE-Kartusche geladen. Anschließend wurden die Kartuschen mit CHCl<sub>3</sub> durchgespült und die Lösungen nach SPE gesammelt. Um zu überprüfen ob PEG in den Lösungen enthalten war, wurden die Lösungen in einem Gradienten von CHCl<sub>3</sub> nach MeOH mittels HPLC vermessen, weil es bekannt ist, dass PEG2000 in diesem Gradienten eluiert. In den Chromatogrammen dieser Messungen wurde



---

kein Probenpeak beobachtet, welches darauf hinweist, dass PEG2000 in der SPE-Kartusche adsorbiert war. Daraus lässt es sich schließen, dass eine Probemenge von 25 mg PEG die Beladungsgrenze der Kartusche nicht überschreitet.

#### **6.3.5. Totaler Abbau des PLA mit methanolischer NaOH-Lösung**

Die PLA-Proben wurden in 20 g/L in  $\text{CHCl}_3$  aufgelöst. NaOH wurde mit einer Konzentration von 5 g/L in Methanol gelöst. Dann wurde 1 mL der PLA-Lösung mit 100  $\mu\text{L}$  der NaOH-Lösung versetzt, kurz mit Hand gerührt und wenige Minuten zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch einen Spritzenvorsatzfilter filtriert und zur GC-MS-Untersuchung bereitgestellt.

#### **6.4. MALDI-TOF-MS**

Die MALDI-TOF-Untersuchungen wurden an einem AximaTOF<sup>2</sup>-Massenspektrometer (Shimadzu Biotech, Manchester, UK) durchgeführt, das mit einem gepulsten Stickstofflaser (Wellenlänge 377 nm, Pulslänge 3 ns) ausgerüstet ist. Die Beschleunigungsspannung betrug 20 kV. Die Messungen wurden im positiven Reflektormodus durchgeführt.

Als Kalibrierstandard wurden Polyethylenglykol-Standard mit einem gewichtsmittleren Molekulargewicht von 1460 Da verwendet. Als Matrix wurde Dithranol in Dioxan (10 g/L) eingesetzt. Als Addukt-Bildner diente Lithiumchlorid (4 g/L in Wasser). Die Proben, die Matrixlösung und die Salzlösung wurden im Verhältnis 2:2:1 gemischt und auf den Edelstahlprobenträger aufgetragen. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Probenträger ins Massenspektrometer eingeschoben und vermessen. Die Konzentrationen und verwendeten Lösungsmitteln der Proben sind im Ergebnisteil angegeben.

Die Aufnahme und die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software MALDI-TOF-MS der Firma Shimadzu Biotech.

#### **6.5. Pyrolyse-GC-MS**

Die Pyrolyse-GC-MS-Messungen wurden mit dem System GCMS-QP2010 der Firma Shimadzu (Duisburg, Deutschland) durchgeführt, das aus einem Autosampler AS-1020E, einem Pyrolysator PY-2020iD, einem Gaschromatograph GC-2010 und einem Massenspektrometer GCMS-QP2010 Plus besteht.

---

Als Trennsäule wurde eine „Ultra-Alloy 5“-Kapillarsäule (Länge: 30 m, Innendurchmesser: 0.25 mm, Beschichtung: Polyphenylmethylsiloxan 5% Diphenyl, 95% Dimethyl; Dicke: 0.25 µm) verwendet, die von der Firma Frontier Lab (Fukushima, Japan) hergestellt wurde.

Für die Messungen in Abbildung 35 und Tabelle 10 wurden PLA1 und PEG350 jeweils mit einer Konzentration von 1 g/L gelöst und in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. 50 µL der Mischung wurden entnommen, in den Probentiegel gegeben, abgedampft und vermessen.

Für die Starttemperatur der GC wurde 40°C gewählt, nach dem Start der Messung erhöht sich die Temperatur mit einer konstanten Rate von 10 °C/min bis zu einer Endtemperatur von 320 °C. Der Injektor wurde bei 320°C betrieben, was eine Ablagerung von hochsiedenden Produkten aus dem Pyrolysevorgang verhindern soll. Als Injektionsmodus wurde der Splitmodus verwendet, bei einem Splitverhältnis von 200.

Für das Massenspektrometer wurde die Temperatur des Interfaces, des Übergangs von GC ins MS, auf 320 °C eingestellt. Die Ionenquelle hatte eine Temperatur von 260 °C, die Detektorspannung wurde beim Auto-Tuning bestimmt.

Für den Messbereich wurde ein m/z-Bereich von 33 - 500 eingestellt. Die Datenaufnahme erfolgte von 1 - 45 min.

#### **6.6. GC-MS**

Zur GC-MS-Untersuchung wurde das Gerät GCMS-QP5000 (Gaschromatograph GC-17A, Massenspektrometer GCMS-QP5000) der Firma Shimadzu (Duisburg, Deutschland) eingesetzt. Zur Automatisierung der Probeneingaben wurde der GC PAL Autosampler der Firma CTC Analytics AG (Zwingen, Schweiz) installiert. Die GC-Trennung erfolgte über eine SGE BPX5-Säule (Länge: 30m; Innendurchmesser: 0.25 mm; Beschichtung: 5 % Phenylpolysilphenylsiloxan; Dicke: 0.5 µm) der Firma SGE (Victoria, Australien).

Die Starttemperatur der GC betrug 60 °C. Diese Temperatur wurde zuerst 4 min gehalten und dann mit einer Rate 30 °C/min auf 300 °C erhöht. Das Splitverhältnis wurde auf 10 eingestellt. Das Injektionsvolumen betrug 1 µL.

Die Temperatur des Interfaces zwischen GC und MS betrug 250 °C, und war identisch zur Temperatur der Ionenquelle.

Für den Messbereich wurde ein m/z-Bereich von 30 - 310 eingestellt. Die Datenaufnahme erfolgte von 3 - 17 min.

---

## 6.7. Chromatographische Messungen

### 6.7.1. SEC von PLA und deren Abbauprodukten

#### SEC-Messungen in THF (hochmolekulare Proben)

Die SEC-Anlage besteht aus einer 515 Pumpe der Firma Waters (Eschborn, Deutschland) und einem Autosampler AS100 der Firma Thermo Separation Products (TSP). Als Detektoren dienten ein Brechungsindex-Detektor Waters 410 und ein UV-Detektor Waters 486, beides von der Firma Waters (Eschborn, Deutschland). Als chromatographisches Trennsystem wurden drei Säulen der Firma Polymer Standards Service PSS GmbH hintereinander geschaltet, eine SDV  $10^6$  Å, eine SDV  $10^5$  Å und eine SDV  $10^4$  Å. Alle Säulen haben eine Länge von 30 cm, einen Innendurchmesser von 8 mm und Partikelgröße von 5 µm.

Das Injektionsvolumen betrug 100 µL und die Messungen erfolgten mit einer Flussrate von 1 mL/min.

Die Bestimmung der Molekulargewichte erfolgte mittels einer PLA-Kalibrationskurve, die wiederum auf einer Kalibration mit engverteilten Polystyrol-Standards basiert. Für Umrechnung wurden die Parameter  $A = 0.38$  und  $B = 1$  verwendet.<sup>29</sup>

#### SEC-Messungen in THF (niedermolekulare Proben)

Die Messungen wurden mittels einer HPLC-Anlage der 1100 Serie der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, USA) durchgeführt. Bestandteile sind eine G1310A Pumpe, ein G1313A Autosampler, sowie der G1362A RI- und G1314A UV-Detektor.

Das Säulensystem bestand aus einer PL-Gel Mixed D-Säule (300x7.5 mm, 5µm) und zwei PL Oligopore-Säulen (300 x 7.5 mm), alle von der Firma Polymer Laboratories.

Zur Kalibration wurde wie bei den hochmolekularen Proben eine PLA-Kalibration basierend aus Polystyrol-Kalibration und den Parametern  $A = 0.38$  und  $B = 1$  verwendet.

#### SEC-Messungen in Chloroform

Die Anlage für SEC-Messungen in Chloroform bestand aus einem Autosampler (G1313A) und einem Brechungsindexdetektor (RI, G1362A) (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA), und einer Pumpe LC-10AD (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg).

Zur chromatographischen Trennung wurden eine PL-Gel Mixed B (300x7.5 mm, 10µm) und eine PL-Gel Mixed C-Säule (300x7.5 mm, 5µm) hintereinander geschaltet.

Die breite Kalibration basierte auf einer Polystyrolkalibrationskurve mit den Parametern für PLA in  $\text{CHCl}_3$  ( $A = 0.717$  und  $B = 0.957$ )<sup>29</sup>.

### 6.7.2. Gradienten-HPLC und LCCC

Die HPLC-Messungen zur Endgruppencharakterisierung von PLA wurden mit einer HPLC-Anlage der 1100 Serie der Firma Agilent Technologies durchgeführt, die aus einer Pumpe (G1311A), einem Autosampler (G1313A) und einem Säulenofen (G1316A) besteht. Als Detektor wurde ein verdampfender Lichtstreuendetektor (ELSD, Modell PL-ELS1000 der Firma Polymer Laboratories, UK) eingesetzt. Als Säule kam eine Kieselgel-Säule Nucleosil 1000 Å 7 µm (250 x 0.46 mm) der Firma Micharey-Nagel (Dürren, Deutschland) zum Einsatz.

Zur Bestimmung der Eluentenzusammensetzung am Peakmaximum zum Zeitpunkt der Elution wurde folgende Gleichung verwendet:

$$\%THF = (V_E - V_0 - V_D) \cdot \frac{\Delta\%THF}{F \cdot t_G} + [THF]_0 \quad \text{Gleichung 25}$$

$V_E =$	Elutionsvolumen
$V_0 =$	Totvolumen der Säule
$V_D =$	Dwellvolumen des chromatographischen Systems
$\Delta\%THF =$	prozentuelle Änderung des HFiP-Anteils während des Gradienten
$[THF]_0 =$	THF-Anteil zu Beginn der Elution
$F =$	Flussrate
$t_G =$	zeitliche Dauer des Gradienten

Die Summe aus Tot- und Dwellvolumen wurde bestimmt, indem eine PLA-Probe in  $CHCl_3$  injiziert, dann bei einem bestimmten Elutionsvolumen der Eluent sprunghaft auf THF umstellt wurde. Wird vom Elutionvolumen der Probe das Elutionsvolumen zum Zeitpunkt der Umschaltung subtrahiert, ergibt sich die Summe des Tot- und Dwellvolumens, die im Fall des verwendeten HPLC-Systems 3.5 mL beträgt.

### 6.7.3. Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von PHB

#### SEC und SEC-Lichtstreuung-Messungen in Chloroform

Für die SEC und SEC-LS-Messungen in Chloroform wurde eine HPLC-Anlage der Serie 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) verwendet. Die Anlage bestand aus einer binären Pumpe (G1312A) und einem Autosampler (G1329A). Die Detektion erfolgte durch einen Brechungsindex-Detektor (RI) G1362A (Agilent) und ein Vielwinkellichtstreuendetektor (MALLS) DAWN® DSP (Wyatt Technology Europe GmbH, Dernbach).

---

### SEC-Lichtstreuung in TFE

Die für Messungen in TFE verwendete Anlage bestand aus einer Spritzenpumpe (Teledyne Isco 100DX, Teledyne Technologies Company, Lincoln, Nebraska), einem Autosampler (G1313A) und dem Differentialdifraktometer (RI, G1362A) der Firma Agilent (Santa Clara, Kalifornien, USA), sowie einem DAWN® DSP-Lichtstredetektor (Wyatt Technology Europe GmbH, Dernbach).

### SEC-Viskositätskopplung in Chloroform

Für SEC-Viskositätsmessungen wurde die gleiche Anlage wie bei den SEC-Messungen von PLA in CHCl<sub>3</sub> (Kap. 6.7.1) verwendet, an welche zusätzlich ein Viskosimeter ETA2010 der Firma WEG Dr. Bures GmbH (Dallgow, Deutschland) installiert wurde.

### Bestimmung der Geräte-Konstanten des Lichtstreu- und RI-detektors und dn/dc-Werte von PHB

Der Lichtstredetektor wurde mit Toluol kalibriert unter der Annahme, dass Toluol bei 633 nm ein Rayleigh-Verhältnis von  $2.153 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$  hat.

Die Geräte-Konstante des RI-Detektors wurde mit Polystyrol-Standard in Chloroform als Elutionsmittel bestimmt, wobei ein dn/dc-Wert von  $0.169 \text{ cm}^3/\text{g}^{87}$  angenommen wurde.

Mit Kenntniss der Geräte-Konstante des RI-Detektors konnten die dn/dc-Werte von PHB in Chloroform und TFE mit Hilfe der Gleichung 26 berechnet werden:

$$A = k_{RI} \cdot c \cdot \frac{dn}{dc} \quad \text{Gleichung 26}$$

wobei A die Peakfläche,  $k_{RI}$  die Gerätekonstante und c die Probenkonzentration bedeutet. Hierzu wurden mehrere PHB-Proben vermessen und die Mittelwerte bestimmt. Daraus ergab sich ein dn/dc-Wert von  $0.033 \text{ cm}^3/\text{g}$  für PHB in CHCl<sub>3</sub>, und  $0.1297 \text{ cm}^3/\text{g}$  für PHB in TFE.

### 6.7.4. Datenerfassung

Die Datenaufnahme und Auswertung der SEC-LS-Messungen wurden mit dem Programm Astra 4.90.08 der Firma Wyatt Technolony durchgeführt. Die Daten der SEC-, SEC-Viskosität- und HPLC-Messungen erfolgten mit Hilfe der Software WinGPC Unity (PSS Polymer Standard Service, Mainz).

---

## **7. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen**

---

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde einerseits die Molekulargewichtsverteilung von PHB bestimmt und die Gültigkeit der universellen Kalibration überprüft, andererseits die Endgruppen von Polylactiden charakterisiert.

### **Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von PHB**

Zur Bestimmung der wahren Molekulargewichte von PHB-Proben wurde die SEC mit der statischen Lichtstreuung gekoppelt. Die daraus ermittelten Molekulargewichte wurden mit den polysytrolequivalenten Molekulargewichten verglichen. Die relativen Molekulargewichte aus Polystyrol-Kalibration liegen ca. 17 % höher als die wahren Molekulargewichte.

Durch die Kopplung der SEC mit Viskositätsdetektor konnte es gezeigt werden, dass PHB und Polystyrol im verwendeten chromatographischen System (SDV/Chloroform) wechselwirkungsfrei eluieren und somit der universellen Kalibration gehorchen.

Die Gültigkeit der universellen Kalibration bedeutet, dass für diese Messbedingungen eine eindeutige Korrelation der wahren PLA-Molmassen mit den Polysytrol-Molmassen besteht. Somit kann eine mit kommerziellen Polystyrolstandards erstellte SEC-Kalibrationskurve in eine Kalibrationskurve umgerechnet werden, welche die Bestimmung der wahren PHB-Molmassen ermöglicht. Die hierfür benötigten Umrechnungsparameter wurden in dieser Arbeit auch ermittelt.

### **Endgruppencharakterisierung von PLA**

Zur Charakterisierung der Endgruppen in hochmolekularen PLA-Proben, die sich aufgrund der hohen Molmassen einer direkten Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS entziehen, wurde eine neue Methode basierend auf einem partiellen PLA-Abbau entwickelt.

Zum Abbau wurden PEG-Monomethylether und NaOH eingesetzt, wobei reines PLA mit der Endgruppe aus Initiator und PLA-PEG-Copolymere entstehen. Die Konzentrationen und Mengenverhältnisse der Reaktanden wurden optimiert um Molekulargewichte der Abbauprodukte zu erhalten, die eine Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS ermöglichen. Es wurde eine Gradienten-HPLC-Methode entwickelt, mit der es gelang, reines PLA von PLA-PEG-Copolymeren zu trennen. Hierdurch ist es möglich, im Molekulargewicht verringerte

---

PLAs mittels MALDI-TOF-MS zu untersuchen und dadurch die initiierenden Alkohole zu identifizieren. Mittels Pyrolyse-GC-MS konnte dabei nachgewiesen werden, dass eine saubere Trennung des PLA aus den Abbauprodukten nicht gelingt, wenn zum Abbau Methanol oder ein PEG mit mittleren Molekulargewicht von 350 g/mol (PEG350) verwendet wird. Hingegen konnte eine saubere Trennung unter Verwendung von PEG mit dem mittleren Molekulargewicht von 2000 g/mol (PEG2000) erzielt werden. Zur Abtrennung des reinen PLAs für die MALDI-TOF-MS-Untersuchung wurde eine Methode mittels Festphasenextraktion (SPE) entwickelt, die im Vergleich zu HPLC viel weniger Zeit und Lösungsmitteln in Anspruch nimmt. Durch den partiellen Abbau mit PEG2000 und anschließende SPE-Fraktionierung gelang es, unterschiedliche Ester-Endgruppen mit MALDI-TOF-MS zu identifizieren. Hingegen konnte die Carbonsäure-Endgruppe nicht identifiziert werden, was wahrscheinlich durch die Veresterung der Carbonsäure durch PEG bedingt ist. Darüber hinaus konnten Endgruppen mit gleichen Restmassen, wie z.B. PLA-Zyklen und die Endgruppenkombinationen Butylester/OH und Nonylester/OH, in MALDI-TOF-MS nicht unterschieden werden.

Als weitere Methode wurde GC-MS herangezogen um Endgruppen von PLA zu charakterisieren. Hierzu wurden die Proben zunächst mit methanolischer NaOH-Lösung vollständig zu Monomeren abgebaut. Durch den Totalabbau mit nachfolgender GC-MS-Untersuchung konnten die als Initiatoren verwendeten Startalkohole identifiziert werden. Im Gegensatz zur MALDI-TOF-MS konnten hierbei auch Endgruppen gleicher Molmassen (strukturisomere Alkohole) unterschieden werden. Wie bei MALDI-TOF-Untersuchung konnte Carbonsäure-Endgruppe nicht identifiziert werden, was auf Veresterung der Säure-Gruppe durch Methanol zurückzuführen ist. Durch Kombination der MALDI-TOF- und GC-MS-Untersuchung ist es jedoch möglich, Ester-Endgruppen auszuschließen und somit das Vorliegen von Carbonsäureenden zu untermauern.

Schließlich wurde eine chromatographische Trennmethode entwickelt, um PLAs nach Endgruppen zu trennen. Hierzu wurden die kritischen Punkte für PLA-Proben unterschiedlicher stereochemischen Zusammensetzungen bestimmt. Es konnte ein geringer Endgruppeneffekt, nämlich eine gegenüber Ester-Endgruppe stärkere Adsorption durch Carbonsäure-Endgruppe beobachtet werden. Aufgrund der nur geringen Auflösung war es jedoch unmöglich die Proben sauber zu trennen. Auf Basis der kritischen Punkte wurde ein Stufengradient entwickelt, mit dem reine PLLAs von den L/D-Mischungen getrennt werden konnten. Aus den Messungen wurde festgestellt, dass die stereochemische

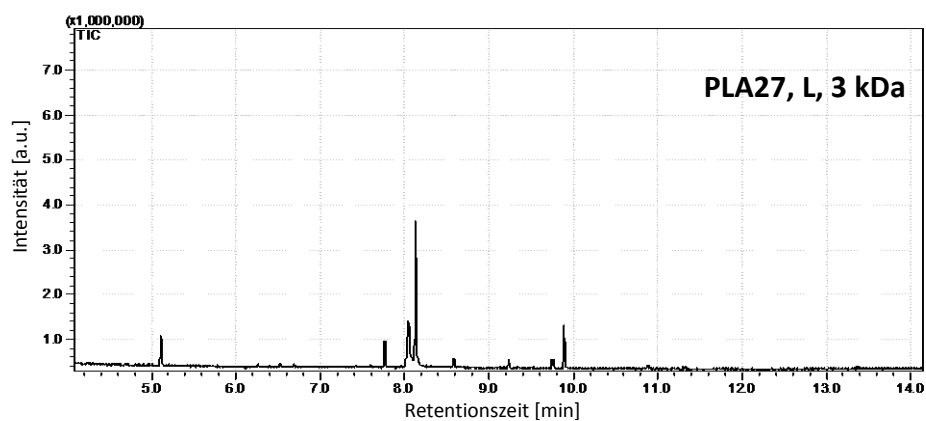
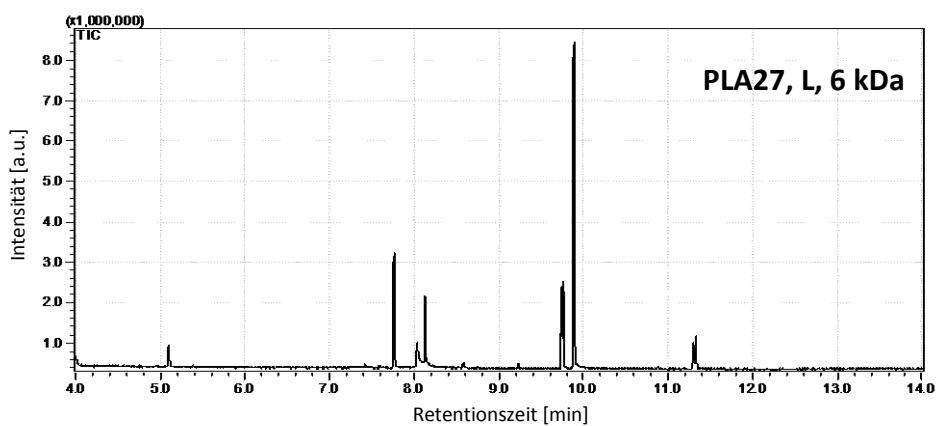
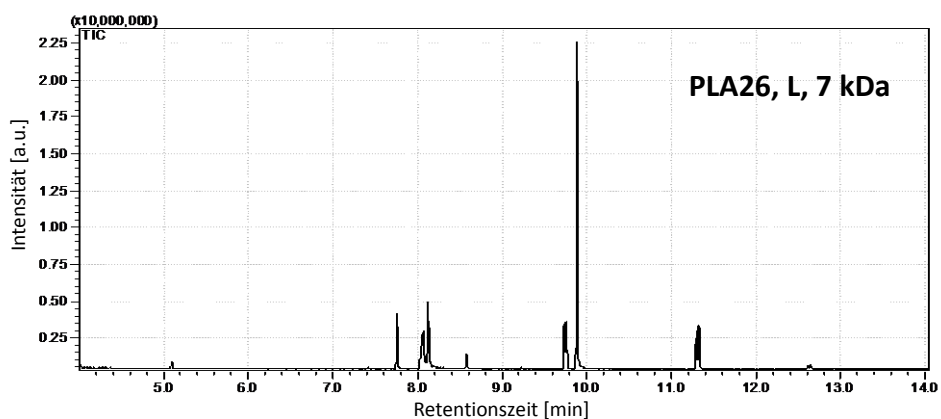
---

Zusammensetzung den entscheidenden Effekt für das Elutionsvolumen der PLAs auf der Kieselgel-Phase hat und die Endgruppen nur eine untergeordnete Rolle spielt.



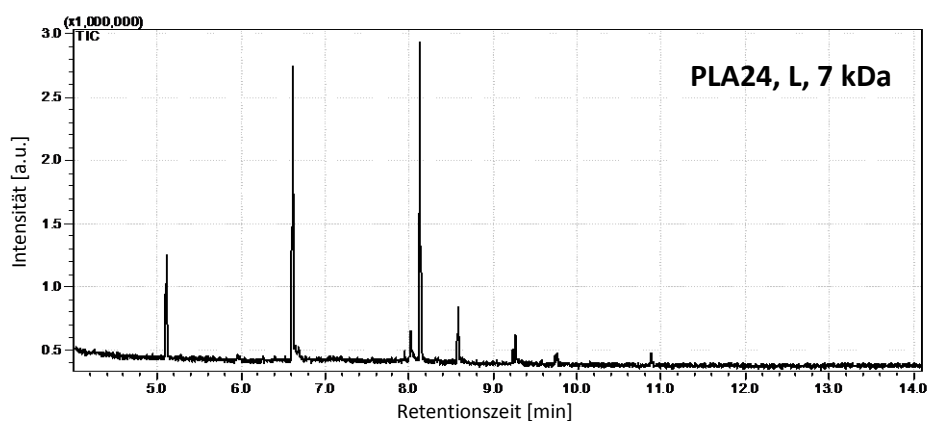
## 8. Anhang

### 8.1. GC-Chromatogramme der Proben mit Octylester/OH-Endgruppen



Retentionszeit [min]	Korrespondierende Struktur
7.75	1-Octanol
9.87	Octyllactat
8.06	Ethylhexylsäure (Katalysatorrest)
8.6	Dilactid (Monomerrest)
8.1	Methyllactat
5.1 & 9.75 & 11.3	„unbekannte“ Peaks

## 8.2. GC-Chromatogramm der mit 1,4-Butandiol gestarteten Probe



Retentionszeit [min]	Korrespondierende Struktur
6.62	1,4-Butanol
9.87	Octyllactat
8.6	Dilactid (Monomerrest)
8.1	Methyllactat
8.06	Ethylhexylsäure (Katalysatorrest)
5.1	„unbekannte“ Peaks

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

[ $\eta$ ]	intrinsische Viskosität
a	Mark-Houwink-Exponent
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
dn/dc	Brechungsindexinkrement
EG	Endgruppe
ELSD	Evaporated Light Scattering Detector / Verdampfender Lichtstreuendetektor
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Hochleistungsflüssigchromatographie
K	Mark-Houwink-Parameter
KTFAc	Kaliumtrifluoracetat
LAC	Liquid Adsorption Chromatography / Adsorptionschromatographie
LCCC	Chromatographie unter kritischen Bedingungen
LiCl	Lithiumchlorid
LS	Lichtstreuendetektor
M	Molekulargewicht
M <sub>n</sub>	zahlenmittleres Molekulargewicht
M <sub>w</sub>	gewichtsmittleres Molekulargewicht
m/z	Massen-zu-Ladungs-Verhältnis
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight - Mass Spectroscopy
MALLS	Multi Angle Laser Light Scattering Detector / Vielwinkellichtstreuendetektor
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NaOH	Natriumhydroxid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance / Kernresonanzspektroskopie
PDLA	Poly(D-Lactid)
PDLLA	Poly(D, L-Lactid)
PEG	Polyethylenglykol-monomethylether

---

PEG350	Polyethylenglykol-monomethylether	mit	dem	mittleren
	Molekulargewicht von ca. 350 g/mol			
PEG2000	Polyethylenglykol-monomethylether	mit	dem	mittleren
	Molekulargewicht von ca. 2000 g/mol			
PHA	Polyhydroxyalkanoate			
PHB	Polyhydroxybutyrat / hydroxybuttersäure			
PLA	Polylactid / Polymilchsäure			
PLLA	Poly(L-Lactid)			
PMMA	Polymethylmethacrylat			
PS	Polystyrol			
Py-GC-MS	Pyrolyse-Gaschromatographie-Massenspektrometrie			
RI	Brechungsindexdetektor			
RT	Retentionzeit			
SDV	Polystyrol-co-divinylbenzol			
SEC	Size Exclusion Chromatography / Größenausschlusschromatographie			
SIM	Single Ion Monitoring			
SPE	Solid Phase Extraction / Festphasenextraktion			
TFE	2,2,2-Trifluoroethanol			
THF	Tetrahydrofuran			
TIC	Total Ion Current / Totalionenstrom			
UV	Ultraviolettdetektor			
V <sub>E</sub>	Elutionsvolumen			
V <sub>h</sub>	hydrodynamisches Volumen			

---

## Literaturverzeichnis

---

1. Vink, E. T. H.; Ra'bagó, K. R.; Glassner, D. A.; Gruber, P. R. *Polym Degrad Stabil* **2003**, 80, 403-419.
2. Beucker, S.; Marscheider-Weidemann, F., Zukunftsmarkt Biokunststoffe. Umweltbundesamt (UBA) Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU): 2007; p 54.
3. Amlinger, F.; Fritz, I., *Biokunststoffe Nachhaltig einführen - erfassen - verwerten*. Amt der Niederösterreichischen Landesregierung, Gruppe Raumordnung, Umwelt und Verkehr: St. Pölten, Österreich, 2008; p 135.
4. Ahmed, J.; Varshney, S. K. *International Journal of Food Properties* **2010**, 14, (1), 37-58.
5. Henton, D. E.; Gruber, P.; Lunt, J.; Randadll, J., Polylactic Acid Technology. In *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*, Mohanty, A. K.; Misra, M.; Drzal, L. T., Eds. CRC Taylor&Francis: 2005; pp 527-578.
6. Arshady, R. *Journal of Controlled Release* **1991**, 17, (1), 1-21.
7. Bendix, D. *Polym Degrad Stabil* **1998**, 59, 129-135.
8. Artsis, M. I.; Bonartsev, A. P.; Iordanskii, A. L.; Bonartseva, G. A.; Zaikov, G. E. *Mol Cryst Liq Cryst* **2012**, 555, 232-262.
9. Yamaguchi, M.; Arakawa, K. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, 103, 3447-3452.
10. Cai, Z. J.; Hou, C. W.; Yang, G. *Carbohydr Polym* **2012**, 87, (1), 650-657.
11. Lai, S. M.; Don, T. M.; Huang, Y. C. *J Appl Polym Sci* **2006**, 100, (3), 2371-2379.
12. F.-D. Kopinke, M. R., K. Mackenzie, M. Moeder, O. Wachsen. *Polym Degrad Stabil* **1996**, 53, 329-342.
13. Yang, L.; Chen, X.; Jing, X. *Polym Degrad Stabil* **2008**, 93, (10), 1923-1929.
14. Najafi, N.; Heuzey, M. C.; Carreau, P. J.; Wood-Adams, P. M. *Polym Degrad Stabil* **2012**, 97, 554-565.
15. Kopinke, F.-D.; Mackenzie, K. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **1997**, 40-41, 43-53.
16. Kunioka, M.; Doi, Y. *Macromolecules* **1990**, 23, (7), 1933-1936.
17. Ema Zagar, A. K. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 628-636.
18. Gogolewski, S.; Jovanovic, M.; Perren, S. M. *Polym Degrad Stabil* **1993**, 40, (3), 313-322.

- 
19. Grassie, N.; Murray, E. J. *Polym Degrad Stabil* **1984**, 6, (3), 127-134.
  20. Kale, G.; Kijchavengkul, T.; Auras, R.; Rubino, M.; Selke, S. E.; Singh, S. P. *Macromolecular Bioscience* **2007**, 7, (3), 255-277.
  21. Marchessault, R.; Okamura, K.; Su, C. J. *Macromolecules* **1970**, 3, (6), 735-740.
  22. Khabbaz, F.; Karlsson, S.; Albertsson, A.-C. *J Appl Polym Sci* **2000**, 78, (13), 2369-2378.
  23. B. Steinhoff, Y. W., S. Piecha, I. Alig, Prozessbedingter Abbau von Polymilchsäure. *Kunststoffe* 2007.
  24. Biela, T.; Duda, A.; Rode, K.; Pasch, H. *Polymer* **2003**, 44, (6), 1851-1860.
  25. Biela, T.; Duda, A.; Pasch, H.; Rode, K. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2005**, 43, (23), 6116-6133.
  26. Schellhorn, M.; Gores, F.; Kilz, P.; Rad, W., Characterization of the Molecular Weight Distribution of Poly(lactides). In *Bayreuth Polymer & Materials Research Symposium*, Bayreuth University: Bayreuth, Germany, 1999.
  27. Ochiai, S.; Takamoto, T.; Kobayashi, S. POLYLACTIC ACID STEREOCOMPLEX, METHOD FOR PRODUCTION THEREOF, AND NUCLEATING AGENT FOR POLYLACTIC ACID RESIN. 08/19/2010, 2010.
  28. Torres, A.; Li, S. M.; Vert, M. *J Appl Polym Sci* **1996**, 62, (13), 2295-2302.
  29. *Polylactic Acid (PLA) for new biobased packaging*, in *CORNET Final report*; Deutsches Kunststoff-Institut: 2011.
  30. Janigová, I.; Lacík, I.; Chodák, I. *Polym Degrad Stabil* **2002**, 77, (1), 35-41.
  31. Bloembergen, S.; Holden, D. A.; Bluhm, T. L.; Hamer, G. K.; Marchessault, R. H. *Macromolecules* **1989**, 22, (4), 1663-1669.
  32. Yu, G.-e.; Marchessault, R. H. *Polymer* **2000**, 41, 1087-1098.
  33. Bradel, R.; Kleinke, A.; Reichert, K. H. *Makromol Chem-Rapid* **1991**, 12, (10), 583-590.
  34. Majid, M. I. A.; Ismail, J.; Few, L. L.; Tan, C. F. *European Polymer Journal* **2002**, 38, (4), 837-839.
  35. Akita, S.; Einaga, Y.; Miyaki, Y.; Fujita, H. *Macromolecules* **1976**, 9, (5), 774-780.
  36. Marchess.Rh; Okamura, K.; Su, C. J. *Macromolecules* **1970**, 3, (6), 735-740.
  37. Cicero, J. A.; Dorgan, J. R.; Dec, S. F.; Knauss, D. M. *Polym Degrad Stabil* **2002**, 78, (1), 95-105.
  38. Villalobos, M.; Awojulu, A.; Greeley, T.; Turco, G.; Deeter, G. *Energy* **2006**, 31, (15), 3227-3234.
  39. Cooper, T. R.; Storey, R. F. *Macromolecules* **2008**, 41, (3), 655-662.
  40. Ju, M. J.; Gong, F. R.; Cheng, S. J.; Gao, Y. *Int J Polym Sci* **2011**.

- 
41. Baez, J. E.; Marcos-Fernandez, A.; Galindo-Iranzo, P. *J Polym Res* **2011**, 18, (5), 1137-1146.
  42. Trimpin, S. Methodische Entwicklung der MALDI-TOF Massenspektrometrie für Grenzbereiche der Makromolekülanalytik. Dissertation, Universität Mainz, Mainz, 2002.
  43. Krüger, R.-P.; Much, H.; Schulz, G. *Macromolecular Symposia* **1996**, 110, (1), 155-176.
  44. Ralph-Peter Krüger, J. F., Günter Schulz, Maren Heinemann, Methodenkopplung zur Polylactidcharakterisierung. *Labor Praxis* 2003, p 56.
  45. Jacobsen, S. Darstellung von Polylactiden mittels reaktiver Extrusion. Dissertation, Stuttgart, Stuttgart, 2000.
  46. Ajioka, M.; Enomoto, K.; Suzuki, K.; Yamaguchi, A. *B Chem Soc Jpn* **1995**, 68, (8), 2125-2131.
  47. Vink, E. T. H.; Rabago, K. R.; Glassner, D. A.; Gruber, P. R. *Polym Degrad Stabil* **2003**, 80, (3), 403-419.
  48. Gruber, P.; O'Brien, M., NatureWorks™ PLA. In *Biopolymers - Polyesters III applications and commercial products*, Doi Y, S. A., Ed. Wiley-VCH: Weinheim, 2002; Vol. 4, pp 235-49.
  49. Jamshidi, K.; Hyon, S. H.; Ikada, Y. *Polymer* **1988**, 29, (12), 2229-2234.
  50. Lee, S. Y.; Choi, J. I. *Waste Manage* **1999**, 19, (2), 133-139.
  51. Tokiwa, Y.; Ugwu, C. U. *J Biotechnol* **2007**, 132, (3), 264-272.
  52. Guiochon, G.; Guillemin, C. L. *Review of Scientific Instruments* **1990**, 61, (11), 3317-3339.
  53. Schomburg, G., *Gaschromatographie. Grundlagen, Praxis, Kapillartechnik*. 2 ed.; VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim: 1987.
  54. Ohnesorge, J. Quantitative Kapillarelektrophorese-Massenspektrometrie – Untersuchung der Präzision mittels verschiedener Interner Standards. Dissertation, TU Braunschweig, Mainz, 2006.
  55. Raith, K. BEITRÄGE ZUR ANWENDUNG DER MASSENSPEKTROMETRIE IN DER LIPIDANALYTIK. Dissertation, Uni Halle, Halle, 1999.
  56. Montaudo, G.; Lattimer, R. P., *Mass Spectrometry of Polymers*. CRC Press Boca Raton, 2002.
  57. Mlynek, M. Massenspektrometrie-Kopplung zur Bestimmung der chemischen Zusammensetzung von (Meth)acrylat-copolymeren. Technische Universität Darmstadt, 2011.
  58. Wolf, M. *Physik in unserer Zeit* **1981**, 3, 90-95.
  59. Pasch, H.; Schrepp, W., *MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers*. Springer-Verlag: Heidelberg, 2003.

- 
60. Schriemer, D. C.; Li, L. *Anal Chem* **1996**, 68, (17), 2721-2725.
  61. Mass, V. Strukturaufklärung komplexer Polymere mittels MALDI-CID-MS. Dissertation, TU Darmstadt, Darmstadt, 2010.
  62. Hanton, S. D.; Clark, P. A. C.; Owens, K. G. *J Am Soc Mass Spectr* **1999**, 10, 104-111.
  63. Overberg, A.; M. Karas, U. B.; Kaufmann, R.; Hillenkamp, F. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1990**, 4, (8), 293-296.
  64. Overberg, A.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Cotter, D. R. J. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1991**, 5, (3), 128-131.
  65. Zenobi, R.; Knochenmuss, R. *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, 17, (5), 337-366.
  66. Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Organic Mass Spectrometry* **2005**, 27, (4), 472-480.
  67. Metzger, S. Massenspektrometrische Analytik komplexer Peptidgemische. Dissertation, Uni Düsseldorf, 2001.
  68. Schriemer, D. C.; Li, L. *Anal Chem* **1997**, 69, (20), 4176-4183.
  69. Schriemer, D. C.; Li, L. *Anal Chem* **1997**, 69, (20), 4169-4175.
  70. Wu, K. J.; Odom, R. W. *Analytical Chemistry News & Features* **1998**, 456A-461A.
  71. Pasch, H.; Trathnigg, B., *HPLC of polymers*. Springer: Berlin, 1997.
  72. Radke, W., Chromatography of Polymers. In *Macromolecular Engineering*, Matyjaszewski, K. G., Y.; Leibler, L., Ed. Wiley-VCH: Weinheim, 2007; Vol. 3, pp 1881-1936.
  73. Benoît, H.; Grubisic, Z.; Rempp, P.; Decker, D.; Zilliox, J. G. *Journal of Chemical Physics* **1966**, 63, (11-12), 1507-1514.
  74. Grubisic, Z.; Rempp, P.; Benoît, H. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Letters* **1967**, 5, (9), 753-759.
  75. Kilz, P.; Radke, W.; Strunz, S., oftmals unbekannt - GPC-Kalibration mit breiten Proben. *GIT Fachzeitschrift* 2010, pp 896-897.
  76. Mahabadi, H. K.; O'Driscoll, K. F. *J Appl Polym Sci* **1977**, 21, 1283-1287.
  77. Held, D., GPC Tipps & Tricks - Welche Lichtstreuemethode ist die richtige? *Laborpraxis* April 2008, p 56.
  78. Wyatt, P. J. *Anal Chim Acta* **1993**, 272, (1), 1-40.
  79. Zimm, B. H. *The Journal of Chemical Physics* **1948**, 16, (12), 1093-1099.
  80. Edler, B. Online-Probenaufbereitungsverfahren aus komplexer wäßriger Matrix: Einsetzbarkeit von Crossflow-Filtrationsmodulen und Mikro-Adsorptionssäulen. Dissertation, Uni Karlsruhe, Karlsruhe, 1999.
  81. Brun, Y. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **1999**, 22, (20), 3027-3065.



- 
82. Bashir, M. A.; Brull, A.; Radke, W. *Polymer* **2005**, 46, (10), 3223-3229.
  83. Chromabond HR-Xpert (Produkt-Broschür). Macherey-Nagel.
  84. Wang, S.; Huang, W.; Fang, G. Z.; He, J. X.; Zhang, Y. *Anal Chim Acta* **2008**, 606, (2), 194-201.
  85. Stoob, K.; Singer, H. P.; Goetz, C. W.; Ruff, M.; Mueller, S. R. *J Chromatogr A* **2005**, 1097, (1-2), 138-147.
  86. Cueto, R.; Gutierrez-Wing, M.; Stevens, B.; Rusch, K. *Polymer Preprints* **2008**, 49, (2), 803-804.
  87. Brandrup, J.; Immergut, E. H.; Grulke, E. A., *Polymer Handbook*. 4 ed.; John Wiley & Sons New York, 1999; Vol. 1.
  88. Corniber, J.; Marchess, R. *Journal of Molecular Biology* **1972**, 71, (3), 735-756.
  89. Behnken, G. Biologisch abbaubare Polyester - Neue Wege mit Bismutkatalysatoren. Dissertation, Universität Hamburg, 2008.
  90. NatureWorksLLC, Evaluation of %D-Lactic Acid Content of Polylactide (PLA) Samples by Gas Chromatography (GC) Using a Flame Ionization Detector(FID)-External Release Version.
  91. Fan, Y. J.; Nishida, H.; Hoshihara, S.; Shirai, Y.; Tokiwa, Y.; Endo, T. *Polym Degrad Stabil* **2003**, 79, (3), 547-562.
  92. Fan, Y. J.; Nishida, H.; Shirai, Y.; Endo, T. *Green Chem* **2003**, 5, (5), 575-579.
  93. Schön, I.; Dorbath, B., *Chemische Aufgaben*. Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag: München, 1998; p 145.
  94. Day, J. N. E.; Ingold, C. K. *Transactions of the Faraday Society* **1941**, 686-705.
  95. [http://www.vias.org/tmanalytik\\_germ/hl\\_ms\\_gcms.html](http://www.vias.org/tmanalytik_germ/hl_ms_gcms.html) aufgerufen am 30.03.2013

---

16.07.2013

Li, Tiantian  
Heinrich-Delp-Str. 5-App.1  
64297 Darmstadt

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Tiantian Li  
Darmstadt, den 16.07.2013

---

16.07.2013

Li, Tiantian  
Heinrich-Delp-Str. 5-App.1  
64297 Darmstadt

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Tiantian Li  
Darmstadt, den 16.07.2013

---

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name : Tiantian Li  
Geburtsdaten : 04.11.1983 in Shandong, VR China

## Akademischer Werdegang

02.2010 - heute      Promotion  
Fraunhofer-Institut für Betriebsfestigkeit und Systemzuverlässigkeit LBF,  
Bereich Kunststoffe, Gruppe Polymeranalytik  
  
Thema: „Charakterisierung von Biopolymeren“  
- Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von PHB  
mittels SEC mit Lichtstreu- und Viskosimetrie-Detektor  
- Endgruppencharakterisierung von Polylactiden mittels  
MALDI-TOF-MS, GC-MS und HPLC  
  
06.2009 – 01.2010      Diplomarbeit am Deutschen Kunststoff Institut (DKI)  
Thema: „Stereochemische Trennung von Polylactiden mittels HPLC“  
(Note: 1,0)  
  
04.2004 – 05.2009      Technische Universität Darmstadt  
Studiengang: Chemieingenieurwesen, Diplom  
Hauptvertiefung: Makromolekulare Chemie  
Nebenvertiefung: Technische Chemie  
(Abschlussnote: 1,66)  
  
08.2001 – 10.2003      Tongji Universität in Shanghai VR China  
Studiengang: Zahnmedizin, Bachelor (unterbrochen)  
  
09.1989 – 07.2001      Grund-, Mittel-, Oberschule in Xintai, Shandong VR China

## Auszeichnungen

01.2011      Best Poster Award in *Fifth International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules (SCM-5)* in Amsterdam, Niederlande  
  
12.2006      Dr. Anton Keller-Preis für hervorragenden Vordiplom-Abschluss  
12.2003      Erster Preis Stipendium an der Tongji-Universität, Shanghai

## Sprachkenntnisse

Chinesisch      Muttersprache  
Deutsch      verhandlungssicher  
Englisch      konversationssicher

Darmstadt, den 01.August.2013